



Industria y Comercio
S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

04-33093

54. TÍTULO Peptidos que actúan como agonistas de receptor de GLP-1
y como antagonistas del receptor del glucagón y sus métodos de uso
farmacológicos

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL Agón 37/21 C 12 N 13/40

71. SOLICITANTE Bayer pharmaceuticals corporation

DOMICILIO West Haven, Connecticut, Estados Unidos de América.

74. APODERADO Emilio Fenero
Código No 1092

22. BOGOTÁ, D. C., _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



04 033093 00

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 04033093 00000000 Folios: 182
Fecha (GMD): 2004-04-07 16:44:28
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.
☐ Capítulo I.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION**
sociedad constituida y existente bajo las leyes del estado de Delaware, Estados Unidos de América
Dirección: 400 Morgan Lane,
West Haven, Connecticut 06516,
Estados Unidos de América
Domicilio: West Haven, Connecticut,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 217 92 11
E-mail: clientes@camyp.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

1. **Clark PAN**
22362 Princenton Place,
Castro Valley, California 94552,
Estados Unidos de América

3. **Kevin B. CLAIRMONT**
80 Merwin Circle,
Cheshire, Connecticut 06410,
Estados Unidos de América.

2. **James WHELAN**
210 Summer Hill Road,
Madison, Connecticut 06443,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US02/31693

Fecha: Octubre 4 de 2002

Publicación Internacional No. WO 03/040309 A2

Fecha: Mayo 15 de 2003

6

Título (54)

**PÉPTIDOS QUE ACTUAN COMO AGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLP-1
Y COMO ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLUCAGON Y SUS
METODOS DE USO FARMACOLÓGICO**

7

Clasificación Internacional (51) C12N ^{15/00}, C07K ^{16/00}, A01N ^{37/18}

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Octubre 5 de 2001

(31) Número de Solicitud

60/327.730

9

Comprobante de pag N .: 04 - 23, 930

Fecha: Marzo 23 de 2004

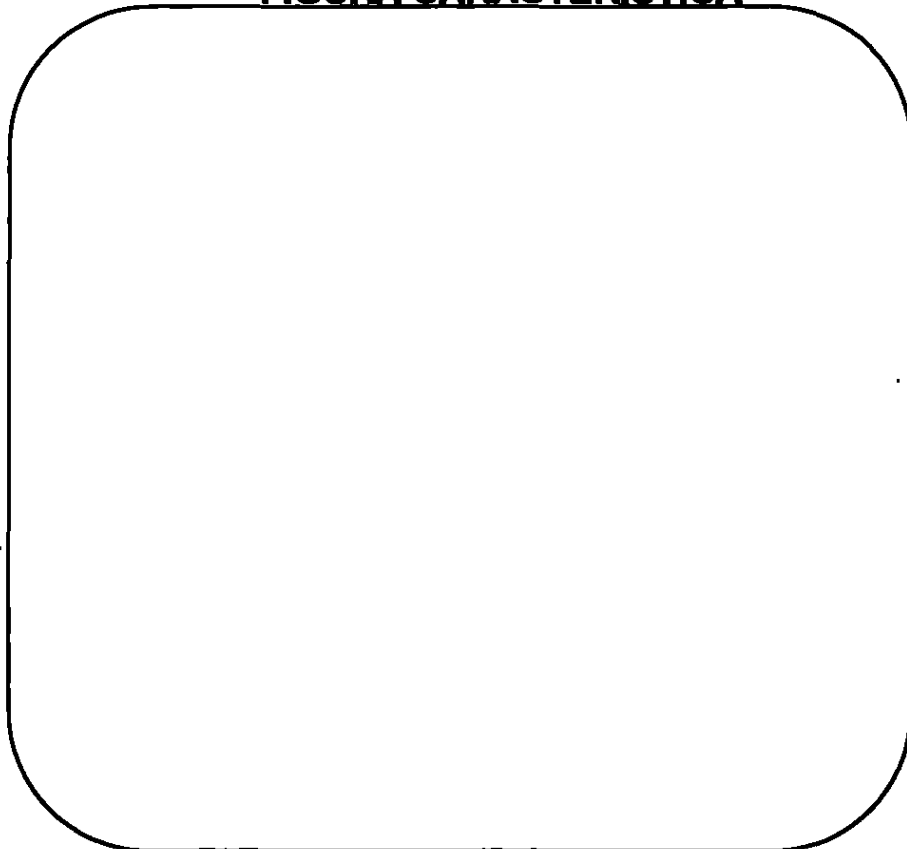
10

Anex s:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 422.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☒ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros:
FORMA PCT/IB/306 NOTIFICACIÓN DEL REGISTRO DE UN CAMBIO (NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE). En donde consta el cambio de nombre del solicitante.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA: Emilio Ferrero

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

PRP

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION

400 Morgan Lane
domiciliado (s) en/of West Haven, CT 06516
United States of America

44375
5829

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela,

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72035, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys that law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose, I (we) authorize the attorneys to represent me (us) before any entity or person, with or without jurisdiction, specially those administrative, contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtaining of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ

CAVELIER ABOGADOS

WFODE01-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

4

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: The United States of America

THIS PUBLIC DOCUMENT

2. has been signed by ELAINE PORTER

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC

4. in the State of Connecticut for the term of July 1, 2001 to June 30, 2006

CERTIFIED

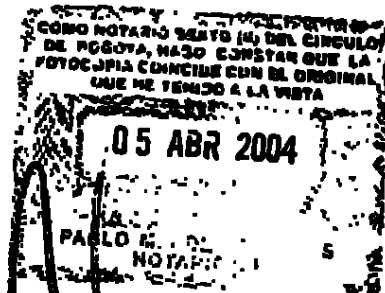
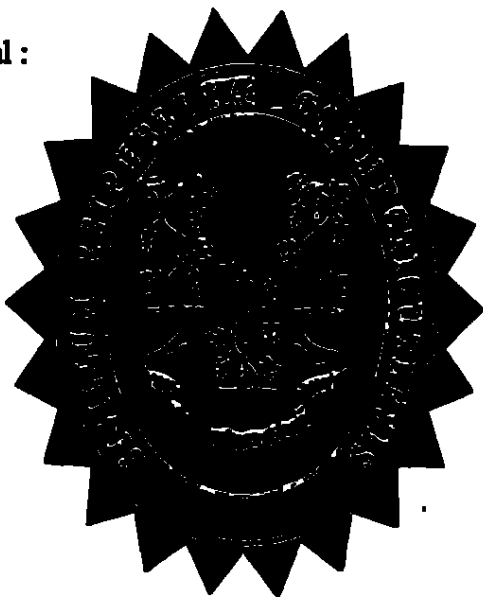
5. at Hartford, Connecticut

6. on February 5, 2004

7. by SUSAN BYSIEWICZ Secretary of the State of Connecticut

8. Number : 2004-1177

9. Seal :



10. Signature

Susan Bysiewicz

Secretary of the State

la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contenciosos/administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiales.

mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

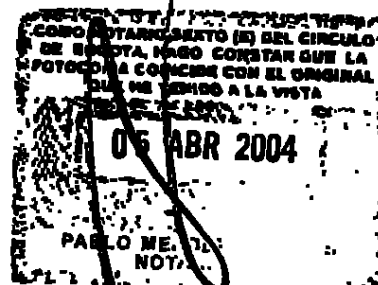
Dado y firmado hoy/Given and signed this 30 January 2004

en/n West Haven, Connecticut, United States of America

por/by Jeffrey M. Greenman

Assistant Secretary of Bayer Pharmaceuticals Corporation

Firma/Signature

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los 30 días del mes de Enero
de 2004 compareció(eron) ante mí,
Jeffrey M. Greenman

Secretario Asistente de Bayer Pharmaceuticals Corporation

Quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en
representación de la Sociedad/compañía denominada
Bayer Pharmaceuticals Corporation

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*
1. Certificado de Constitución de Bayer Pharmaceuticals Corporation fechado 14 Nov. 2002;
 2. Resolución de la Junta Directiva fechado 1 Enero, 2003
 3. Consentimiento escrito de fundador único de Bayer Pharmaceuticals Corporation fechado 14 Noviembre 2002, eligiendo la Junta Directiva

2.1. Que Bayer Pharmaceuticals Corporation
es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de
acuerdo con las leyes de 1 Estado de Delaware
Estados Unidos de America

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
400 Morgan Lane, West Haven, Connecticut
06516, Estados Unidos de America

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) Jeffrey M. Greenman
está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad West Haven
Estado Connecticut; Estados Unidos de America
Hoy 30 Enero de 2004

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this 30th day of January
2004 appeared before me
Jeffrey M. Greenman

Assistant Secretary of Bayer Pharmaceuticals Corporation

who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named
Bayer Pharmaceuticals Corporation

I certify:

1. That I have seen the following documents:*
- 1) Certificate of Incorporation of Bayer Pharmaceuticals Corporation dated 14 November 2002;
 - 2) Resolution of the Board of Directors dated 1 January 2003;
 - 3) Written Consent of the Sole Incorporator of Bayer Pharmaceuticals Corporation dated 14 November 2002 electing the Board of Directors;

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Bayer Pharmaceuticals Corporation
is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws of the State of Delaware,
United States of America

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
400 Morgan Lane, West Haven, Connecticut 06516

United States of America

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of
Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set
forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Jeffrey M. Greenman
is(are) authorized to grant the present Power of Attorney

City West Haven
State Connecticut, United States of America
This 30th day of January 2004

By: Paul R. Berry
Vice President, General Counsel and Secretary
of Bayer Pharmaceuticals Corporation

PAUL R. BERRY
NOTARY PUBLIC

NOTARIAL CERTIFICATE

United States of America
State of Connecticut
County of New Haven
City of West Haven

On this the 30th day of the month of January 2004, before me, Notary Public practicing in this locality, appeared Paul R. Berry, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument, who acknowledged himself to be Vice President, General Counsel and Secretary of Bayer Pharmaceuticals Corporation, and that acting in such capacity and with authorization, he executed the foregoing instrument on behalf of Bayer Pharmaceuticals Corporation for the purposes therein contained.

In witness thereof I set my hand.

Elaine Porter
NOTARY PUBLIC
My Commission Expires

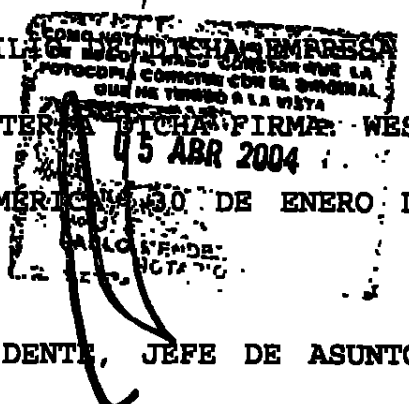
Elaine Porter
Notary Public

My Commission Expires June 30, 2008

[NOTARIAL SEAL]

TRADUCCIÓN OFICIAL 031/2004 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA Y MEDIANTE EL CUAL BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION EMPRESA DOMICILIADA EN 400 MORGAN LANE, WEST HAVEN, CT 06516, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929, GONZALO PERDOMO, TPA 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ TPA 23555 Y A GERMÁN CAVELIER, TPA 832. EXPEDIDO Y FIRMADO EL 30 DE ENERO DE 2004 EN WEST HAVEN, CONNECTICUT, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA POR JEFFREY M. GREENMAN, SUBSECRETARIO DE BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION. FIRMA: (ILEGIBLE)

CERTIFICADO NOTARIAL EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL DE FECHA 30 DE ENERO DE 2004 POR EL CUAL SE CERTIFICA LA COMPARECENCIA DE JEFFREY M GREENMAN A NOMBRE DE BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION Y PARA CERTIFICAR LA EXISTENCIA LEGAL, EL DOMICILIO DE DICHA EMPRESA Y LA CAPACIDAD DE M. GREENMAN PARA COMPROMETER LA FIRMA: WEST HAVEN, CONNECTICUT, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, 30 DE ENERO DE 2004.



POR: FIRMADO: PAUL R. BERRY, VICE PRESIDENTE, JEFE DE ASUNTOS JURÍDICOS Y SECRETARIO DE BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION.

CERTIFICADO NOTARIAL

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

ESTADO DE CONNECTICUT, CONDADO DE NEW HAVEN

CIUDAD DE WEST HAVEN

Hoy 30 de enero de 2004, ante mí, notario público practicante en esta localidad, compareció Paul R. Berry, conocido mío como la persona cuyo nombre aparece escrito en el documento precedente, y quien reconoció ser el vicepresidente, jefe de asuntos jurídicos y secretario de Bayer Pharmaceuticals Corporation y que actuando en calidad de tal y con autorización, firmó el documento precedente a nombre de Bayer Pharmaceuticals Corporation para los objetivos allí contenidos. En testimonio de lo anterior, firmo: ELAINE PORTER, notario público. Sello: ELAINE PORTER, notario público. Mi cargo vence el 30 de junio de 2006.

APOSTILLA:

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por ELAINE PORTER

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO

4. del estado de Connecticut para el período entre el primero de julio de 2001 y el 30 de junio de 2006

CERTIFICADO

5. en Hartford, Connecticut

6. el 5 de febrero de 2004

7. por Susan Bysiewicz Secretario del estado de Connecticut

8. Número 2004-1177 ✓

9. Sello:

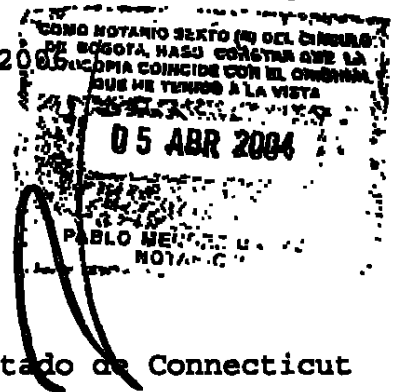
El sello del estado de Connecticut

10. Firma: Susan Bysiewicz, secretario de estado.

COLO-14125-841-001-0; WPCL002G. ID 5326

Bogotá, 16 de febrero de 2004.

Eduardo Calado
Eduardo Calado Negrete
"TRADUCTOR OFICIAL"
BOS - ESPAÑOL
Ene. 31: Febrero de 2004



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

NO SE AGUJE
DISTRIBUCION DEL TEXTO

12914

16 FEB 16 12:51

Edgardo Celado

JEFE DE LEGALIZACIONES
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
CALLE DE BOGOTÁ D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTA FE
B. BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LAS FIRMAS
Edgardo Celado
CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EN ESTA NOTARIA
16 FEB 2004

[Signature]
PABLO ESTEBAN
BARAJAS
Notario Publico

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CONFORME CON EL ORIGINAL
QUE ME TRUENO A LA VISTA
105 ABR 2004
PABLO V

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

OCT 09 2003

CAROL G. BRUNN

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)GREENMAN, Jeffrey, M.
Bayer Pharmaceuticals Corporation
400 Morgan Lane
West Haven, CT 06516
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 18 September 2003 (18.09.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference MSB-7288-PCT	
International application No. PCT/US02/31693	International filing date (day/month/year) 04 October 2002 (04.10.02)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address BAYER CORPORATION 100 Bayer Road Pittsburgh, PA 15205 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No. 510 705-7901	
	Facsimile No. 510 705-7904	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☒ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION 400 Morgan Lane West Haven, CT 06516 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No. 510 705-7901	
	Facsimile No. 510 705-7904	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority	☒ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.71.40	Authorized officer Ghislaine BORNET Telephone No. (41-22) 338 8525
--	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 82bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MAHONEY, John, W.
Bayer Corporation
800 Dwight Way
P. O. Box 1986
Berkeley, CA 94701
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 13 February 2003 (13.02.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference MSB-7288-PCT	
International application No. PCT/US02/31693	International filing date (day/month/year) 04 October 2002 (04.10.02)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The international Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address CLAIRMONT, Kevin, B. 80 Merwin Circle Cheshire, CT 06410 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

As per Box 2 above, CLAIRMONT, Kevin, B. has been added as applicant and inventor for the US only.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Ghislaine BORNET Telephone No. (41-22) 338 8625
--	--

Form PCT/IB/308 (March 1994)

905466381

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MAHONEY, John, W.
Bayer Corporation
800 Dwight Way
P. O. Box 1988
Berkeley, CA 94701
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 10 February 2003 (10.02.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference MSB-7288-PCT	
International application No. PCT/US02/31693	International filing date (day/month/year) 04 October 2002 (04.10.02)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent ☐ the common representative
Name and Address WHELAN, James 210 Summer Hill Road Madison, CO 08443 United States of America	State of Nationality IE	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence
Name and Address WHELAN, James 210 Summer Hill Road Madison, CT 06443 United States of America	State of Nationality IE	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☐ the designated Offices concerned	
☒ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned	
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Ghislaine BORNET
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338 8525

Form PCT/IB/308 (March 1994)

006448789

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MAHONEY, John, W.
Bayer Corporation
800 Dwight Way
P. O. Box 1986
Berkeley, CA 94701
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 13 February 2003 (13.02.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference MSB-7288-PCT	
International application No. PCT/US02/31693	International filing date (day/month/year) 04 October 2002 (04.10.02)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address BAYER CORPORATION 800 Dwight Way P.O. Box 1986 Berkeley, CA 94701 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No. 510 705-7901	
	Facsimile No. 510 705-7904	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address BAYER CORPORATION 100 Bayer Road Pittsburgh, PA 15205 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No. 510 705-7901	
	Facsimile No. 510 705-7904	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Ghislaine BORNET Telephone No. (41-22) 338 8525
--	--

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
15 May 2003 (15.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/040309 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C12N (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KB, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TO).
- (21) International Application Number: PCT/US02/31693 ✓
- (22) International Filing Date: 4 October 2002 (04.10.2002) ✓
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/327,730 5 October 2001 (05.10.2001) US ✓
- (71) Applicant (for all designated States except US): BAYER CORPORATION [US/US]; 100 Bayer Road, Pittsburgh, PA 15205 (US). ✓
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): PAN, Clark [US/US]; 22362 Princeton Place, Castro Valley, CA 94552 (US). WHELAN, James [IB/US]; 210 Summer Hill Road, Madison, CT 06443 (US). CLAIRMONT, Kevin, B. [US/US]; 80 Merwin Circle, Cheshire, CT 06410 (US). ✓
- (74) Agent: MAHONEY, John, W.; Bayer Corporation, 800 Dwight Way, P. O. Box 1986, Berkeley, CA 94701 (US). ✓
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW.
- Declarations under Rule 4.17:
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TO)
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:
- without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/040309 A2

(54) Title: PEPTIDES ACTING AS BOTH GLP-1 RECEPTOR AGONISTS AND GLUCAGON RECEPTOR ANTAGONISTS AND THEIR PHARMACOLOGICAL METHODS OF USE

(57) Abstract: The invention provides polypeptides that act both as an agonist of the GLP-1 receptor and an antagonist of the glucagon receptor. Such polypeptides are useful for treating individuals with type 2 diabetes or other metabolic disorders.

**PEPTIDES ACTING AS BOTH GLP-1 RECEPTOR AGONISTS AND GLUCAGON
RECEPTOR ANTAGONISTS AND THEIR PHARMACOLOGICAL METHODS OF
USE**

FIELD OF THE INVENTION

[01] This invention relates to newly identified polypeptides that act both as an agonist of the GLP-1 receptor and an antagonist of the glucagon receptor and the use of such polypeptides for therapeutic purposes. More particularly, polypeptides of the present invention are useful in stimulating the release of insulin from pancreatic beta cells in a glucose-dependent manner and reducing glucagon-mediated secretion of glucose from the liver, thereby providing a treatment option for those individuals afflicted with a metabolic disorder such as diabetes, hyperglycemia, impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, prediabetic states, and obesity.

BACKGROUND OF THE RELATED ART

[02] Diabetes is characterized by impaired insulin secretion manifesting itself among other things by an elevated blood glucose level in the diabetic patient. Underlying defects lead to a classification of diabetes into two major groups: type 1 diabetes (or insulin dependent diabetes mellitus, IDDM), which arises when patients lack insulin-producing beta-cells in their pancreatic glands, and type 2 diabetes (or non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM), which occurs in patients with an impaired beta-cell insulin secretion and/or alterations in insulin action.

[03] Type 1 diabetic patients are currently treated with insulin, while the majority of type 2 diabetic patients can be treated with agents that stimulate beta-cell function or with agents that enhance the tissue sensitivity of the patients towards insulin. Over time, almost one-half of type 2 diabetic subjects lose their response to these agents and then must be placed on insulin therapy. The drugs presently used to treat type 2 diabetes

[04] include alpha-glucosidase inhibitors (PRECOSE[®], VOGLIBOSE[™], and MIGLITOL[®]), insulin sensitizers (e.g., Avandia[™], Actos[™] and Rezulin[™]), insulin secretagogues (sulfonylureas ("SFUs") and other agents that act by the ATP-dependent K⁺ channel), and GLUCOPHAGE[™] (metformin HCl).

[05] Alpha-glucosidase inhibitors. Alpha-glucosidase inhibitors reduce the excursion of postprandial glucose by delaying the absorption of glucose from the gut. These drugs are safe and provide treatment for mild to moderately affected diabetic subjects. However, gastrointestinal side effects have been reported in the literature and limit their effectiveness.

[06] Insulin sensitizers. Insulin sensitizers are drugs that enhance the body's response to insulin. Thiazolidinediones such as Avandia[™] (rosiglitazone) and Actos[™] activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and modulate the activity of a set of genes that have not been well described. Hepatic effects (e.g., drug induced hepatotoxicity and elevated liver enzyme levels) do not appear to be a significant problem in patients using Avandia[™] and Actos[™]. Even so, liver enzyme testing is recommended every two months in the first year of therapy and periodically thereafter. Avandia[™] and Actos[™] treatments are associated with fluid retention, edema, and weight gain. Avandia[™] is not indicated for use with insulin because of concern about congestive heart failure. Rezulin[™] (troglitazone), the first drug in this class, was withdrawn because of elevated liver enzyme levels and drug-induced hepatotoxicity.

[07] Insulin secretagogues. Sulfonylureas (SFUs) and the non-sulfonylureas, Nateglinide and Pepaglinide act through the ATP-dependent potassium channel to cause glucose-independent insulin secretion. These drugs are standard therapy for type 2 diabetics that have mild to moderate fasting hyperglycemia. The insulin secretagogues have limitations that include a potential for inducing hypoglycemia, weight gain, and high primary and secondary failure rates. Ten to 20% of initially treated patients fail to show a significant treatment effect (primary failure). Secondary failure is demonstrated by an additional 20-30% loss of treatment effect after six months of treatment with insulin secretagogues. Insulin treatment is required in 50% of the insulin secretagogues responders after 5-7 years of therapy (Scheen *et al.*, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 6:533-543,

[08] 1989). Nateglinide and Pepaglinide are short-acting drugs that need to be taken three times a day. They are used only for the control of post-prandial glucose and not for control of fasting glucose.

[09] GLUCOPHAGE™ is a biguanide that lowers blood glucose by decreasing hepatic glucose output and increasing peripheral glucose uptake and utilization. The drug is effective at lowering blood glucose in mildly and moderately affected subjects and does not have a side effect of weight gain or a potential to induce hypoglycemia. However, GLUCOPHAGE™ has a number of side effects, including gastrointestinal disturbances and lactic acidosis. GLUCOPHAGE™ is contraindicated in diabetics over the age of 70 and in subjects with impaired renal or liver function. Finally, GLUCOPHAGE™ has the same primary and secondary failure rates as the insulin secretagogues.

[10] Insulin treatment is instituted after diet, exercise, and oral medications have failed to control blood glucose adequately. This treatment has several drawbacks: it is an injectable, it can produce hypoglycemia, and it can cause weight gain. The possibility of inducing hypoglycemia with insulin limits the extent that hypoglycemia can be controlled.

[11] Problems with current treatments necessitate new therapies to treat type 2 diabetes. In particular, new treatments to retain normal (*i.e.*, glucose-dependent) insulin secretion are needed. Given glucagon-like peptide-1's ("GLP-1") role in promoting glucose-regulated insulin secretion in the pancreas, GLP-1 receptor agonists are potentially valuable in the treatment of such diseases. Moreover, glucagon receptor antagonists should prove valuable in treating type 2 diabetes given glucagon's role in elevating plasma glucose by stimulating hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis.

[12] GLP-1 and glucagon are members of a family of structurally related peptide hormones, the glucagon/secretin family. Within this family, GLP-1(7-36) and GLP-1(7-37) (30 amino acids and 31 amino acids, respectively) and glucagon (30 amino acids) constitute a highly homologous set of peptides. In addition, these two hormones originate from a common precursor, preproglucagon which, upon tissue-specific processing, leads to production of GLP-1 predominantly in the intestine and glucagon in the pancreas. The

[13] receptors for these two peptides are homologous (58% identity) and belong to the family of G-protein coupled receptors.

[14] GLP-1 and glucagon both play major roles in overall glucose homeostasis. GLP-1 lowers plasma glucose concentrations mediated by glucose dependent insulin secretion, whereas glucagon increases plasma glucose concentrations. Given the important roles of both GLP-1 and glucagon in maintaining normal blood glucose concentrations, there has been considerable interest in the identification of GLP-1 receptor agonists and glucagon receptor antagonists. Clinical studies have demonstrated the ability of GLP-1 infusion to promote insulin secretion and to normalize plasma glucose in diabetic subjects. However, GLP-1 is rapidly degraded and has a very short half-life in the body. Furthermore, GLP-1 causes gut motility side effects at or near its therapeutic doses. Therefore, GLP-1 itself has significant limitations as a therapeutic agent, and modified versions of the peptide with enhanced stability are being pursued. Non-peptide agonists of the GLP-1 receptor have not been described to date.

[15] Peptide analogs of glucagon have been identified which act as glucagon antagonists and reduce hyperglycemia in diabetic rats. However, no peptide glucagon antagonist has moved beyond preclinical development. A number of structurally diverse non-peptide glucagon receptor antagonists have been reported in the scientific and patent literature. However, attempts to identify small molecule inhibitors of the glucagon receptor have met with limited success *in vivo*. The only antagonist of glucagon action known to be active in a clinical study is a compound identified as BAY 27-9955. A potential side effect of glucagon antagonism is hypoglycemia.

[16] Because of the potential side effects associated with administering either a GLP-1 receptor agonist or a glucagon receptor antagonist alone, a combination therapy would have an advantage of maintaining the desired lowering of blood glucose while reducing the side effects. Co-administration, however, requires a single formulation and delivery approach that yields appropriate pharmacokinetic profiles for both peptides. This could be a major obstacle to the development of such a therapeutic.

[17] Based on the foregoing, considerable potential exists for a single therapeutic peptide functioning as both a GLP-1 agonist and a glucagon antagonist *in vivo*.

SUMMARY OF THE INVENTION

[18] This invention provides novel polypeptides that function both as an agonist of the GLP-1 receptor and an antagonist of the glucagon receptor and which are effective in the treatment of diseases and conditions that can be ameliorated by agents having both GLP-1 receptor agonist and glucagon receptor antagonist activity. Polypeptides of the present invention provide a new therapy for patients with, for example, metabolic disorders, such as those resulting from decreased endogenous insulin secretion, in particular type 2 diabetics, or for patients with impaired glucose tolerance, a prediabetic state that has a mild alteration in insulin secretion or impaired fasting glucose, or obesity.

[19] One aspect of the invention is a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NOS:6-32, as well as fragments, derivatives and variants of polypeptides that function as both an agonist of the GLP-1 receptor and an antagonist of the glucagon receptor at substantially the same level as the polypeptides shown in SEQ ID NOS:6-32 (collectively, "polypeptides of the invention").

[20] Other embodiments of the invention include polynucleotides that encode polypeptides of the invention and the attendant vectors and host cells necessary to recombinantly express the polypeptides.

[21] Still other embodiments of the invention provide methods of treating diabetes and/or other diseases or conditions affected by polypeptides of the invention in mammals, including humans. The methods involve administering a therapeutically effective amount of any of the polypeptides of the present invention to a mammal.

[22] The invention also provides recombinant and synthetic methods of making polypeptides of the invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

[23] Figure 1 is a restriction map of a typical plasmid containing a GST-peptide fusion polynucleotide coding sequence.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

[24] The invention provides novel polypeptides, as well as fragments, derivatives variants, and analogs thereof that function as both an agonist of the GLP-1 receptor and an antagonist of the glucagon receptor. Polypeptides of the invention function *in vivo* as both GLP-1 receptor agonists and glucagon receptor antagonists in the prevention and/or treatment of such diseases or conditions as diabetes, hyperglycemia, impaired glucose intolerance, impaired fasting glucose, and obesity.

[25] GLP-1 and glucagon are members of a family of structurally related peptide hormones, the glucagon/secretin family. The stacking alignment below shows the primary structural relationships:

Glucagon	HSQGTFTSDYSKYLEGQAAKEFLAWLVKGR (SEQ ID NO:1)
GLP-1 (7-36)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFLAWLVKGR-NH ₂ (SEQ ID NO:2)
GLP-1 (7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFLAWLVKGRG (SEQ ID NO:3)

Single-letter abbreviations for amino acids can be found in Zubay, Biochemistry 2d ed., 1988, MacMillan Publishing, New York, p. 33. These polypeptides play a role in overall glucose homeostasis: GLP-1 lowers plasma glucose concentrations, whereas glucagon increases plasma glucose concentrations.

[26] Given GLP-1's role in promoting glucose-regulated insulin secretion in the pancreas, GLP-1 receptor agonists are potentially valuable in the treatment of metabolic disorders and other diseases. Moreover, glucagon receptor antagonists should also prove valuable in treating disease given glucagon's role in elevating plasma glucose by stimulating hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis. However, these facts alone do not guarantee glucose reduction *in vivo* without inducing significant side effects.

[27] The invention provides new polypeptides that are both GLP-1 receptor agonists and glucagon receptor antagonists. Without being bound to theory, we believe that polypeptides of the invention are capable of reducing glucose levels *in vivo* by stimulating insulin release from pancreatic beta cells in a glucose-dependent manner, while at the same time reducing glucagon-mediated secretion of glucose from the liver.

GLP-1 receptor agonist and glucagon receptor antagonist polypeptides

[28] Polypeptides of the invention function both as a GLP-1 receptor agonist and a glucagon receptor antagonist. The GLP-1 receptor agonist component of such polypeptides activates the GLP-1 receptor in one or more *in vitro* or *in vivo* assays for GLP-1 receptor activation. Examples of such assays include, but are not limited to, *in vitro* assays for induction of cAMP in RINm5F cells, *in vitro* assays for induction of insulin secretion from pancreatic β -cells, *in vivo* assays for reduction in plasma glucose levels, and *in vivo* assays for elevation in plasma insulin levels as described in the specific examples below.

[29] Polypeptides of the invention also demonstrate glucagon receptor antagonist activity in one or more *in vitro* or *in vivo* assays for inhibition of glucagon receptor activation. Examples of such assays include, but are not limited to, *in vitro* assays to measure inhibition of glucagon-mediated increase in cellular cAMP, *in vitro* assays to measure inhibition of glucagon-mediated glucose release from, for example, cultured hepatocytes, or *in vivo* assays for glucagon stimulated glucose production as described in the specific examples below.

[30] Preferred polypeptides of the invention are selected from the group consisting of (1) SEQ ID NOS:6-32 and (2) fragments, derivatives, variants, and analogs thereof that function as both an agonist of the GLP-1 receptor and an antagonist of the glucagon receptor at substantially the same level as any of the polypeptides shown in SEQ ID NOS:6-32.

[31] Polypeptides of the present invention may be naturally-occurring polypeptides, recombinant polypeptides, or synthetic polypeptides.

Fragments, derivatives, variants, and analogs

[32] Fragment, derivative, variant, and analog polypeptides retain substantially the same biological function or activity as, for example, polypeptides shown in SEQ ID NOS:6-32. "Substantially the same biological function or activity" is about 30% to 100%

(i.e., 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, or 100%) or more of the same biological activity of the full-length polypeptide to which it is compared.

Derivatives

[33] Derivatives include polypeptides of the invention that have been chemically modified to provide an additional structure and/or function. For example, polyethylene glycol (PEG) or a fatty acid can be added to a polypeptide to improve its half-life. Fusion polypeptides which confer targeting specificity or an additional activity also can be constructed, as described in more detail below.

[34] Derivatives can be modified by either a natural process, such as posttranslational processing, or by chemical modification techniques, both of which are well known in the art. Modifications can occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains, and the amino or carboxyl termini. It will be appreciated that the same type of modification may be present to the same or varying degrees at several sites in a given polypeptide. Also, a variant may contain one or more different types of modifications. Polypeptides may be branched, for example, as a result of ubiquitination, and they may be cyclic, with or without branching.

[35] Other chemical modifications include acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphatidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cysteine, formation of pyroglutamate, formulation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, pegylation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination. (See, for instance, T. E. Creighton, *PROTEINS, STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES*, 2nd ed., W.H. Freeman and Company, New York (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, *Meth. Enzymol* 182:626-46 (1990); Rattan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663:48-62, 1992).

[36] Derivatives also include mature polypeptides that have been fused with another polypeptide, such as for example human serum albumin, to improve their pharmacokinetic profile. Fusion of two polypeptides can be accomplished by any means known to one skilled in the art. For example, a DNA encoding human serum albumin and a DNA sequence encoding a polypeptide of the invention can be cloned into any mammalian expression vector known to one skilled in the art. Location of a polypeptide of the invention N-terminal to the other polypeptide is preferred, because it appears that a free N-terminal histidine is required for GLP-1 receptor activity (Kawa, *Endocrinology* Apr;124(49):1768-73, 1989). The resulting recombinant fusion protein can then be expressed by transforming a suitable cell line, such as HKB or CHO, with the vector and expressing the fusion protein.

[37] Preferred derivatives include polypeptides of the invention (SEQ ID NOS:6-32) to which a PEG moiety or a fatty acid moiety has been attached. The PEG moiety can be, for example, a PEG with a molecular weight greater than 22 kDa, preferably a molecular weight of between 25kDa and 100 kDa (e.g., 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 or 100 kDa), and more preferably a molecular weight of between 35 kDa and 45 kDa (e.g., 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, or 45 kDa). Examples of such PEGylated polypeptides are those that contain a 22 kDa PEG moiety attached to the cysteine residue at position 31 of SEQ ID NOS:19 or 25. See SEQ ID NOS:20 and 26 and Table 2. Alternatively, a 43 kDa PEG moiety can be attached to the cysteine residue at position 31 of SEQ ID NO:25. See SEQ ID NO:27 and Table 2. A PEG moiety can be added to a cysteine residue of polypeptides of the invention by methods well known in the art, for example, see Example 19.

[38] Other preferred derivatives have a fatty acid moiety attached to the polypeptide. The fatty acid moiety can be, for example, a fatty acid between C₁₂ and C₂₀, preferably C₁₄ and C₁₈, and most preferably a C₁₆ fatty acid. Examples of such polypeptides are SEQ ID NOS:28-32, which contain a C₁₆ (palmitate) fatty acid moiety attached to a lysine residue within the peptide. See Table 2. A fatty acid moiety can be added to a lysine residue of polypeptides of the invention by methods well known in the art, for example, fatty acid acylation (Knudsen *et al.*, *J. Med. Chem.* 43:1664-1669, 2000).

Variants

[39] Variants are polypeptides on the invention that have or more amino acid sequence changes with respect to the amino acid sequences shown in SEQ ID NOS:6-32. Variants also can have amino acids joined to each other by modified peptide bonds, *i.e.*, peptide isosteres, and may contain amino acids other than the 20 naturally occurring amino acids.

[40] Preferably, variants contain one or more conservative amino acid substitutions (*i.e.*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 substitutions), preferably at nonessential amino acid residues. A "nonessential" amino acid residue is a residue that can be altered from a wild-type sequence of a protein without altering its biological activity, whereas an "essential" amino acid residue is required for biological activity. A conservative amino acid substitution is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (*e.g.*, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Non-conservative substitutions would not be made for conserved amino acid residues or for amino acid residues residing within a conserved protein domain.

[41] Conservative amino acid substitutions are preferably at positions 11, 12, 16, 17, or 18 of the consensus polypeptide shown SEQ ID NO:34. Position 11 preferably is R, S, A, K, G, or T and more preferably R, A, G, or S. Position 12 preferably is K, N, R, H, A, S or Q and more preferably K, A, S, or N. Position 16 preferably is K, R, V, I, L, M, F, W, Y, A, S, T, N, Q, G, or H, and more preferably K, V, I, F, A, S, or N. Position 17 preferably is D, E, H, K, R, F, I, L, M, Y, V, W, A, S, T, N, Q, or G, and more preferably R, A, L, M, V, S, H, E, or Q. Position 18 preferably is K, R, F, I, L, Y, V, M, A, G, or H and more preferably K, R, F, I, L, Y or A. All possible combinations of substitutions at positions 11, 12, 16, 17, and 18, including no substitution at any one, two, three, or four of these positions, are specifically envisioned.

[42] Variants also include polypeptides that differ in amino acid sequence due to mutagenesis. Variants that function as both GLP-1 receptor agonists and glucagon receptor antagonists can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, for example, mutants of polypeptides with conservative substitutions at 1 or more positions (*i.e.*, at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 positions) can be screened for GLP-1 receptor agonist activity and glucagon receptor antagonist activity using methods well known in the art and described in the specific examples below.

Analogs

[43] An analog includes a propolypeptide, wherein the propolypeptide includes an amino acid sequence of a polypeptide of the invention. Active polypeptides of the invention can be cleaved from the additional amino acids in the propolypeptide molecule by natural, *in vivo* processes or by procedures well known in the art, such as by enzymatic or chemical cleavage.

Fragments

[44] A fragment is less than a full-length polypeptide of the invention, including a full-length derivative, variant, or analog, which has GLP-1 receptor agonist and glucagon receptor antagonist activity.

Polynucleotides

[45] Any polynucleotide sequence that encodes a polypeptide of the invention can be used to express the polypeptide. Polynucleotides can consist only of a coding sequence for a polypeptide or can include additional coding and/or non-coding sequences.

[46] Polynucleotide sequences encoding a polypeptide of the invention can be synthesized in whole or in part using chemical methods well known in the art (see, for example, Caruthers *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215 – 23, 1980; Horn *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-32, 1980). The polynucleotide that encodes the polypeptide can

then be cloned into an expression vector to express the polypeptide or into a cloning vector, to propagate the polynucleotide.

[47] As will be understood by those of skill in the art, it may be advantageous to produce the polypeptide-encoding nucleotide sequences possessing non-naturally occurring codons. For example, codons preferred by a particular prokaryotic or eukaryotic host can be selected to increase the rate of polypeptide expression or to produce an RNA transcript having desirable properties, such as a half-life, which is longer than that of a transcript generated from the naturally occurring sequence.

[48] The nucleotide sequences disclosed herein can be engineered using methods generally known in the art to alter the polypeptide-encoding sequences for a variety of reasons, including but not limited to, alterations which modify the cloning, processing, and/or expression of the polypeptide or mRNA product. DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides can be used to engineer the nucleotide sequences. For example, site-directed mutagenesis can be used to insert new restriction sites, alter glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, introduce mutations, and so forth.

Vectors

[49] The present invention also includes cloning and expression vectors comprising one or more nucleotide sequences encoding a polypeptide of the invention. The nucleotide sequence can be inserted in a forward or reverse orientation. A DNA sequence may be inserted into a vector by a variety of procedures. In general, a DNA sequence is inserted into an appropriate restriction endonuclease site by procedures known in the art and described in Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed., (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Such procedures and others are deemed to be within the scope of those skilled in the art.

[50] Examples of cloning vectors include, but are not limited to pBR322, pUC18, pUC19, pSport, and pCRII.

[51] In a preferred aspect of this embodiment, an expression vector further comprises regulatory sequences, including, for example, a promoter, operably linked to the coding sequence. Large numbers of suitable expression vectors and promoters are known to those of skill in the art and are commercially available. The following expression vectors are provided by way of example. Bacterial expression vectors include, but are not limited to, pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBaKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTRC99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, PRIT5 (Pharmacia). Eukaryotic expression vectors include, but are not limited to, pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, PSVL (Pharmacia). However, any other cloning or expression vector may be used as long as it is replicable and viable in the desired host. Promoter regions can be selected from any desired gene using CAT (chloramphenicol transferase) expression vectors or other vectors with selectable markers. Two appropriate vectors are pKK232-8 and pCM7. Particular named bacterial promoters include *lacI*, *lacZ*, T3, T7, *gpt*, λ P_R, P_L and *trp*. Eukaryotic promoters include CMV immediate early, HSV thymidine kinase, early and late SV40, LTRs from retrovirus, and mouse metallothionein-I. Selection of an appropriate vector and promoter is well within the level of ordinary skill in the art.

[52] An expression vector also can contain a ribosome binding site for translation initiation, a transcription terminator, and appropriate sequences for amplifying expression. Expression vectors can contain a gene to provide a phenotypic trait for selection of transformed host cells, such as dihydrofolate reductase or neomycin resistance for a eukaryotic cell culture, or such as tetracycline or ampicillin resistance for culture in *E. coli*.

Libraries

[53] In one embodiment, a library of variants is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level and is encoded by a variegated gene library. A library of variants can be produced, for example, by enzymatically ligating a mixture of synthetic oligonucleotides into gene sequences such that a degenerate set of potential variant amino acid sequences is expressible as individual polypeptides or, alternatively, as

a set of larger fusion proteins (for example, for phage display) containing the set of sequences therein.

[54] There are a variety of methods that can be used to produce libraries of potential variants from a degenerate oligonucleotide sequence. Chemical synthesis of a degenerate gene sequence can be performed in an automatic DNA synthesizer, and the synthetic gene then ligated into an appropriate expression vector. Use of a degenerate set of genes allows for the provision, in one mixture, of all of the sequences encoding the desired set of potential analog sequences. Methods for synthesizing degenerate oligonucleotides are known in the art (*see, e.g., Narang, Tetrahedron* 39:3 (1983); Itakura *et al., Annu. Rev. Biochem.* 53:323 (1984); Itakura *et al., Science* 198:1056 (1984); Ike *et al., Nucleic Acid Res.* 11:477, 1983).

[55] Several techniques are known in the art for screening gene products of combinatorial libraries made by point mutations or truncation and for screening cDNA libraries for gene products having a selected property. Such techniques are adaptable for rapid screening of the gene libraries generated by the combinatorial mutagenesis of polypeptides of the invention. The most widely used techniques, which are amenable to high through-put analysis for screening large gene libraries, typically include cloning the gene library into replicable expression vectors, transforming appropriate cells with the resulting library of vectors, and expressing the combinatorial genes under conditions in which detection of a desired activity facilitates isolation of the vector encoding the gene whose product was detected. Recursive ensemble mutagenesis (REM), a technique that enhances the frequency of functional mutants in the libraries, can be used in combination with the screening assays to identify the desired variants.

Host cells

[56] The present invention also provides host cells containing the above-described vectors. The host cell can be a higher eukaryotic cell, such as a mammalian cell, or a lower eukaryotic cell, such as a yeast cell. Alternatively, the host cell can be a prokaryotic cell, such as a bacterial cell.

[57] Host cells can be genetically engineered (transduced, transformed or transfected) with cloning or expression vectors of the invention. The vector may be, for example, in the form of a plasmid, a viral particle, or a phage. Engineered host cells can be cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for activating promoters or selecting transformants. The selection of appropriate culture conditions, such as temperature and pH, are well within the skill of the ordinarily skilled artisan.

[58] As representative examples of appropriate hosts, include, but are not limited to, bacterial cells, such as *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces*; fungal cells, such as yeast; insect cells, such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9; mammalian cells such as CHO, COS or Bowes melanoma. The selection of an appropriate host is deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

[59] Introduction of the construct into the host cell can be effected, for example, by calcium phosphate transfection, DEAE-Dextran mediated transfection, or electroporation (Davis *et al.*, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986). Constructs in host cells can be used in a conventional manner to produce the gene product encoded by the recombinant sequence.

Protein expression

[60] Mature proteins can be expressed in mammalian cells, yeast, bacteria, or other cells under the control of appropriate promoters. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention. Appropriate cloning and expression vectors for use with prokaryotic and eukaryotic hosts are described above and in Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed., (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

[61] Transcription of a DNA encoding polypeptides of the present invention by higher eukaryotes can be increased by inserting an enhancer sequence into the expression vector. Enhancers are *cis*-acting elements of DNA, usually from about 10 to 300 bp, that act on a promoter to increase its transcription. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100 to 270), a cytomegalovirus early promoter enhancer, a polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers.

Generally, recombinant expression vectors will include origins of replication and selectable markers permitting transformation of the host cell, *e.g.*, the ampicillin resistance gene of *E. coli* and *S. cerevisiae* TRP1 gene, and a promoter derived from a highly expressed gene to direct transcription of a downstream structural sequence. Such promoters can be derived from operons encoding glycolytic enzymes such as 3-phosphoglycerate kinase (PGK), α factor, acid phosphatase, or heat shock proteins, among others. The heterologous structural sequence is assembled in appropriate phase with translation, initiation and termination sequences, and preferably, a leader sequence capable of directing secretion of translated protein into the periplasmic space or extracellular medium. Optionally, the heterologous sequence can encode a fusion protein including an N-terminal identification peptide imparting desired characteristics, *e.g.*, stabilization or simplified purification of expressed recombinant product.

[62] After transformation of a suitable host strain and growth of the host strain to an appropriate cell density, the selected promoter is derepressed by appropriate means (*e.g.*, temperature shift or chemical induction), and cells are cultured for an additional period. Cells are typically harvested by centrifugation and disrupted by physical or chemical means. The resulting crude extract is retained for further purification. Microbial cells employed in expression of proteins can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents.

[63] Various mammalian cell culture systems also can be employed to express recombinant protein. Examples of mammalian expression systems include the COS-7 lines of monkey kidney fibroblasts, described by Gluzman, *Cell* 23:175 (1981), and other cell lines capable of expressing a compatible vector, for example, C127, 3T3, CHO, HeLa and HBK cell lines.

Protein purification

[64] Polypeptides of the present invention may be recovered and purified from recombinant cell cultures by methods well known in the art, including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity

chromatography, hydroxyapatite chromatography, and lectin chromatography. High performance liquid chromatography (HPLC) can be employed as a final purification step.

[65] Polypeptides of the invention can be conveniently isolated as described in the specific examples below. A purified polypeptide is at least about 70% pure, that is, the isolated polypeptide is substantially free of cellular material and has less than about 30% (by dry weight) of non-polypeptide material. Preferably, the preparations are 85% through 99% (*i.e.*, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 96, 97, 98, and 99%) pure. Purity of the preparations can be assessed by any means known in the art, such as SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, mass spectroscopy and liquid chromatography.

Post-translational modification

[66] Depending upon the host employed in a recombinant production procedure, polypeptides of the invention may be glycosylated with mammalian or other eukaryotic carbohydrates or may be non-glycosylated. Polypeptides of the invention may also include an initial methionine amino acid residue.

Chemical synthesis

[67] Alternatively, polypeptides of the invention can be produced using chemical methods to synthesize its amino acid sequence, such as by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (see, for example, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149 – 2154, 1963; Roberge *et al*, *Science* 269, 202 – 204, 1995). Polypeptide synthesis can be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis can be achieved, for example, using Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Optionally, fragments of a polypeptide can be separately synthesized and combined using chemical methods to produce a full-length molecule.

[68] A newly synthesized polypeptide can be substantially purified by preparative high performance liquid chromatography (see, for example, Creighton, *Proteins: Structures And Molecular Principles*, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). The composition of a synthetic polypeptide of the present invention can be confirmed by amino acid analysis or sequencing by, for example, the Edman degradation procedure (see,

Creighton, *supra*). Additionally, any portion of the amino acid sequence of the polypeptide can be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with sequences from other proteins to produce a variant polypeptide or a fusion polypeptide.

Pharmaceutical Applications

[69] Polypeptides of the present invention can be used to treat type 2 diabetes (non-insulin dependent diabetes mellitus) and/or to prevent subjects with impaired glucose tolerance, impaired fasting glucose, hypoglycemia, and/or obesity from developing type 2 diabetes.

Pharmaceutical compositions

[70] Polypeptides of the present invention may be combined with a suitable pharmaceutical carrier to form a pharmaceutical composition for parenteral administration. Such compositions comprise a therapeutically effective amount of the polypeptide and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Pharmaceutically acceptable carriers, include but are not limited to, saline, buffered saline, dextrose, water, glycerol, ethanol, and combinations thereof. The formulation should suit the mode of administration.

[71] Pharmaceutical compositions may be administered in a convenient manner, *e.g.*, by oral, topical, intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intranasal, or intradermal routes. Pharmaceutical compositions are administered in an amount, that is effective for treating and/or prophylaxis of the specific indication. Suitable doses range from at least about 3.5 ng of active polypeptide (*i.e.*, not including the weight of a PEG or fatty acid moiety)/kg body weight to about 100 µg/kg body weight per day. In most cases, the dosage is from about 0.1 µg/kg to about 35 µg/kg (*i.e.*, 0.1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, and 35 µg/kg) body weight daily, taking into account the routes of administration, symptoms, etc. These numbers do not take into account the bioavailability of the peptide *in vivo*, in which case more or less may be used to attain the effective dose desired. Determination of a dose is well within the skill of the ordinary artisan and requires only routine screening.

[72] Polypeptides of the present invention may also be employed in combination with other pharmaceutical agents useful in the treatment of diabetes, impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, hyperglycemia, and obesity. Suitable agents include insulin secretagogues, insulin sensitizers, and metformin HCl.

Kits

[73] The invention also provides pharmaceutical packs or kits comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of pharmaceutical compositions of the invention. A notice in a form prescribed by a governmental agency that regulates the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products and reflecting approval by the agency can be associated with the pack or kit.

Gene therapy

[74] A polypeptide of the invention may also be expressed *in vivo*, which is often referred to as "gene therapy." Thus, for example, cells may be engineered with a polynucleotide (DNA or RNA) encoding for the polypeptide *ex vivo* and the engineered cells then provided to a patient to be treated with the polypeptide. Such methods are well known in the art. For example, cells may be engineered by procedures known in the art by use of a retroviral particle containing RNA encoding for polypeptides of the present invention.

[75] In a preferred embodiment, the DNA encoding the polypeptides of the invention is used in gene therapy for disorders such as diabetes. According to this embodiment, gene therapy with DNA encoding polypeptides of the invention is provided to a patient in need thereof, concurrent with, or immediately after diagnosis.

[76] Local delivery of polypeptides using gene therapy may provide the therapeutic agent to the target area, *i.e.*, the pancreas. For instance a pancreas-specific promoter was used to create a beta-cell pancreatic tumor mouse model (Hanahan, *Nature* 315(6015):115-22, 1985).

[77] Both *in vitro* and *in vivo* gene therapy methodologies are contemplated. Several methods for transferring potentially therapeutic genes to defined cell populations are known. See, e.g., Mulligan, *Science* 260: 926-31, 1993. These methods include:

1) Direct gene transfer. See, e.g., Wolff *et al.*, "Direct Gene transfer Into Mouse Muscle *In Vivo*," *Science* 247:1465-68, 1990;

2) Liposome-mediated DNA transfer. See, e.g., Caplen *et al.*, "Liposome-mediated CFTR Gene Transfer To The Nasal Epithelium Of Patients With Cystic Fibrosis," *Nature Med.* 3: 39-46, 1995; Crystal, "The Gene As A Drug," *Nature Med.* 1:15-17, 1995; Gao and Huang, "A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection Of Mammalian Cells," *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179:280-85, 1991;

3) Retrovirus-mediated DNA transfer. See, e.g., Kay *et al.*, "*In Vivo* Gene Therapy Of Hemophilia B: Sustained Partial Correction In Factor IX-Deficient Dogs," *Science* 262:117-19, 1993; Anderson, "Human Gene Therapy," *Science* 256:808-13, 1992.

4) DNA Virus-mediated DNA transfer. Such DNA viruses include adenoviruses (preferably Ad-2 or Ad-5 based vectors), herpes viruses (preferably herpes simplex virus based vectors), and parvoviruses (preferably "defective" or non-autonomous parvovirus based vectors, more preferably adeno-associated virus based vectors, most preferably AAV-2 based vectors). See, e.g., Ali *et al.*, "The Use Of DNA Viruses As Vectors For Gene Therapy," *Gene Therapy* 1:367-84, 1994; United States Patent 4,797,368, and United States Patent 5,139,941.

Gene therapy vector systems

[78] The choice of a particular vector system for transferring a gene of interest will depend on a variety of factors. One important factor is the nature of the target cell population. Although retroviral vectors have been extensively studied and used in a number of gene therapy applications, these vectors are generally unsuited for infecting non-dividing cells. In addition, retroviruses have the potential for oncogenicity. However, recent developments in the field of lentiviral vectors may circumvent some of these limitations. See Naldini *et al.*, *Science* 272:263-7, 1996.

[79] The skilled artisan will appreciate that any suitable gene-therapy vector encoding polypeptides of the invention can be used in accordance with this embodiment. The techniques for constructing such vectors are known. See, *e.g.*, Anderson, *Nature* 392, 25-30, 1998; Verma and Somia, *Nature* 389 239-242, 1998. Introduction of the vector to the target site may be accomplished using known techniques.

[80] Suitable gene therapy vectors include one or more promoters. Suitable promoters which may be used include, but are not limited to, viral promoters (*e.g.*, retroviral LTR, SV40 promoter, adenovirus major late promoter, respiratory syncytial virus promoter, B19 parvovirus promoter, and human cytomegalovirus (CMV) promoter described in Miller *et al.*, *Biotechniques* 7(9): 980-990, 1989), cellular promoters (*e.g.*, histone, pol III, and β -actin promoters), and inducible promoters (*e.g.*, MMT promoter, metallothionein promoter, and heat shock promoter). The selection of a suitable promoter will be apparent to those skilled in the art from the teachings contained herein.

Retroviruses

[81] Retroviruses from which the retroviral plasmid vectors hereinabove mentioned may be derived include, but are not limited to, Moloney Murine Leukemia Virus, spleen necrosis virus, retroviruses such as Rous Sarcoma Virus, Harvey Sarcoma Virus, avian leukosis virus, gibbon ape leukemia virus, human immunodeficiency virus, Myeloproliferative Sarcoma Virus, and mammary tumor virus. In one embodiment, the retroviral plasmid vector is derived from Moloney Murine Leukemia Virus.

[82] The retroviral plasmid vector is used to transduce packaging cell lines to form producer cell lines. Examples of packaging cells which maybe transfected include, but are not limited to, the PB501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+E-86, GP+envAm12, and DAN cell lines as described in Miller, *Human Gene Therapy*, 1: 5-14, 1990. The vector may transduce the packaging cells through any means known in the art. Such means include, but are not limited to, electroporation, the use of liposomes, and CaPO_4 precipitation. In one alternative, the retroviral plasmid vector may be encapsulated into a liposome, or coupled to a lipid, and then administered to a host. The producer cell line generates infectious retroviral vector particles that include the

nucleic acid sequence(s) encoding polypeptides of the invention. Such retroviral vector particles then may be used, to transduce eukaryotic cells, either *in vitro* or *in vivo*. The transduced eukaryotic cells will express the nucleic acid sequence(s) encoding polypeptides of the invention. Eukaryotic cells that can be transduced include, but are not limited to, embryonic stem cells, embryonic carcinoma cells, as well as hematopoietic stem cells, hepatocytes, fibroblasts, myoblasts, keratinocytes, endothelial cells, and bronchial epithelial cells.

Adenoviruses and adeno-associated viruses

[83] Adenoviruses have the advantage that they have a broad host range, can infect quiescent or terminally differentiated cells, such as neurons or hepatocytes, and appear essentially non-oncogenic. See, e.g., Ali *et al.*, 1994, at page 367. Adenoviruses do not appear to integrate into the host genome. Because they exist extrachromosomally, the risk of insertional mutagenesis is greatly reduced. Ali *et al.*, 1994, at page 373.

[84] Adeno-associated viruses exhibit similar advantages as adenoviral-based vectors. However, AAVs exhibit site-specific integration on human chromosome 19 (Ali *et al.*, 1994, at page 377).

Transkaryotic therapy

[85] A different approach to gene therapy is "transkaryotic therapy" wherein the patient's cells are treated *ex vivo* to induce the dormant chromosomal genes to produce the protein of interest after reintroduction to the patient. Transkaryotic therapy assumes the individual has a normal complement of genes necessary for activation. Transkaryotic therapy involves introducing a promoter or other exogenous regulatory sequence capable of activating the nascent genes, into the chromosomal DNA of the patients' cells *ex vivo*, culturing and selecting for active protein-producing cells, and then reintroducing the activated cells into the patient with the intent that they then become fully established. The "gene activated" cells then manufacture the protein of interest for some significant amount of time, perhaps for as long as the life of the patient. U.S. Patent Nos. 5,641,670 and 5,733,761 disclose in detail this concept.

[86] In order that this invention may be better understood, the following examples are set forth. These examples are for the purpose of illustration only, and are not to be construed as limiting the scope of the invention in any manner. All patents, patent applications, and references cited in this disclosure are incorporated herein by reference in their entirety.

EXAMPLES

Example 1

Peptide synthesis methodology

[87] The following general procedure was followed to synthesize some of polypeptides of the invention. Peptide synthesis was carried out by the Fmoc/t-Butyl strategy (Peptide Synthesis Protocols (1994), Volume 35 by Michael W. Pennington & Ben M. Dunn) under continuous flow conditions using Rapp-Polymere PEG-Polystyrene resins (Rapp-Polymere, Tübingen, Germany). At the completion of synthesis, peptides were cleaved from the resin and de-protected using TFA/DTT/H₂O/Triisopropyl silane (88/5/5/2). Peptides were precipitated from the cleavage cocktail using cold diethyl ether. The precipitate was washed three times with the cold ether and then dissolved in 5% acetic acid prior to lyophilization. Peptide identity was confirmed by reversed-phase chromatography on a YMC-Pack ODS-AQ column (YMC, Inc., Wilmington, NC) on a Waters ALLIANCE® system (Waters Corporation, Milford, MA) using water/acetonitrile with 3% TFA as a gradient from 0% to 100% acetonitrile, and by MALDI mass spectrometry on a VOYAGER DE™ MALDI Mass Spectrometer, (model 5-2386-00, PerSeptive BioSystems, Framingham, MA). Matrix buffer (50/50 dH₂O/acetonitrile with 3% TFA) peptide sample was added to Matrix buffer 1/1. Those peptides not meeting the purity criteria of >95% were purified by reversed-phase chromatography on a Waters Delta Prep 4000 HPLC system (Waters Corporation, Milford, MA).

Example 2

Peptide cloning

[88] To establish a robust method for expressing polypeptides of the invention and mutants thereof, nucleotide sequences encoding polypeptides were cloned C-terminal to GST with a single Factor Xa recognition site separating the monomeric peptide and GST.

The gene encoding the Factor Xa recognition site fused to the DNA sequence of the peptide to be produced has been synthesized by hybridizing two overlapping single-stranded DNA fragments (70-90mers) containing a *Bam*HI or *Eco*RI restriction enzyme site immediately 5' to the DNA sequence of the polynucleotide to be cloned, followed by DNA synthesis of the opposite strands via the large fragment of DNA polymerase I (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD).

[89] The DNA sequence chosen for each polynucleotide was based on the reverse translation of the designed amino acid sequence of each peptide. In some cases, the polynucleotide encoding the peptide is generated by PCR mutagenesis (Picard *et al.*, *Nucleic Acids Res* 22: 2587-91, 1994; Sambrook *et al.* (1989) *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) of a polynucleotide already made by the method described above. The double-stranded product is then digested by *Bam*HI and *Eco*RI and ligated into pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech) which has also been cleaved by *Bam*HI and *Eco*RI.

[90] For example, when the DNA sequence the polypeptide identified as SEQ ID NO:7 was cloned into pGEX-6P-1, the following polypeptide sequence was expressed as fusions with glutathione S-transferase (GST): IEGRHSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFLAWLVKGRG (SEQ ID NO:33), where the first 4 amino acids, IEGR, is the factor Xa recognition site and the remaining 31 amino acids is the amino acid sequence identified as SEQ ID NO:7.

[91] The first and last six nucleotides of the nucleic acid sequence encoding the polypeptide identified as SEQ ID NO:7 represent the restriction enzyme sites (*Bam*HI and *Eco*RI) used for cloning into the pGEX6P-1 plasmid (FIG. 1). The "TAATGA" sequence immediately preceding the *Eco*RI site ("GAATTC") encodes two stop codons. The rest of the DNA sequence encodes the Factor Xa-polypeptide identified as SEQ ID NO:7 fusion sequence.

Example 3

Peptide recombinant expression and purification

[92] BL21 (DE3) cells (Stratagene) transformed with a GST-peptide fusion containing plasmids were grown at 37°C until OD₆₀₀ reached 0.6 to 1.0 and induced by 1 mM IPTG (Life Technologies) for 2 hours at 37°C. Two liters of cells were spun at 7,700xg for 15 minutes, and stored at -20°C. The cell pellet was resuspended in 80 ml B-PER bacterial protein extraction reagent (Cat No. 78248, Pierce) and 1x Complete Protease Inhibitor (Roche) until the cell suspension was homogenous. The homogenous mixture was gently shaken at room temperature for 10 minutes. Lysosome and Dnase I were added to a final concentration of 200 µg/ml and 10µg/ml to further solubilize proteins and to reduce viscosity, respectively. The mixture was incubated for an additional 5 minutes. Cellular debris was spun down at 27,000 g for 20 minutes. The supernatant was mixed with 2 mL of pre-washed Glutathione Sepharose 4B resin (Pharmacia) on a shaker overnight at 4 °C. The resin was spun down at 1,500 g for 15 minutes, packed into empty Poly-Prep Chromatography Columns (Bio-Rad), washed with 30 mL PBS followed by 10 mL of Factor Xa buffer (1 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, and 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). The peptides were cleaved off the column with 60 units of Factor Xa (Pharmacia) in 1 mL of Factor Xa buffer, overnight at 4 °C. These eluants were then run on a C₁₈ HPLC (Beckman System Gold), using a 2 mL loop and flow rate of 1 mL/min with the following program: 5 minutes of Buffer A (0.1% TFA/H₂O), 30 minutes of gradient to 100% Buffer B (0.1% TFA/ACN), 10 minutes of Buffer A, 10 minutes of gradient, and 10 minutes of Buffer A. Peak fractions (0.5 mL each) were collected and screened by 10-20% Tricine-SDS gel electrophoresis. The identity of each peptide was confirmed by mass spectrometry using the mass predicted from the amino acid sequence. Typical yields are approximately 50 µg free peptides per liter of *E. coli* culture. Recombinant peptides have been shown to have the same activities as their synthetic versions.

[93] The following table, Table 2, contains some selected polypeptides made according to the peptide synthesis protocol discussed above (Example 1), or recombinantly as described above.

Table 2

Glucagon	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO:1)
GLP-1(7-36)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEQ ID NO:2)
GLP-1(7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO:3)
G1	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLVKGR-NH2 (SEQ ID NO:4)
G5	HSQGTFTSDYSKYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEQ ID NO:5)
G27	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEQ ID NO:6)
G51	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO:7)
G55	HSQGTFTSDYARYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEQ ID NO:8)
G56	HSQGTFTSDYAAAYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEQ ID NO:9)
G57	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEQ ID NO:10)
G58	HSQGTFTSDYAKYLDAAKAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO:11)
G59	HSQGTFTSDYARYLDAKKAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO:12)
G60	HSQGTFTSDYAKYLDAAKAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO:13)
G61	HSQGTFTSDYARYLDAKAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO:14)
G71	HSQGTFTSDYAKYLDARRACEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO:15)
G74	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVCGRG (SEQ ID NO:16)
G75	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKCRG (SEQ ID NO:17)
G76	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKCGG (SEQ ID NO:18)
G77	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRC (SEQ ID NO:19)
G277	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRC(22kD) (SEQ ID NO:20)
G82	HSQGTFTSDYARYLDARRAKEFIAWLVRGRG (SEQ ID NO:21)
G83	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVRGRG (SEQ ID NO:22)
G84	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIAWLVKGRG (SEQ ID NO:23)
G85	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIAWLVRGRGK (SEQ ID NO:24)
G185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVRGRC (SEQ ID NO:25)
G2185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVRGRC(22kD) (SEQ ID NO:26)
G4185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVRGRC(43kD) (SEQ ID NO:27)
G87	HSQGTFTSDYAKYLDARRAK(FA)EFIAWLVKGR-NH2 (SEQ ID NO:28)
G88	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRK(FA) (SEQ ID NO:29)
G90	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIK(FA)WLVRGRG (SEQ ID NO:30)
G182	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVRGRGK(FA) (SEQ ID NO:31)
G183	HSQGTFTSDYARYLDARRAK(FA)EFIKWLVRGRG (SEQ ID NO:32)

(FA): C₁₆ palmitate linked to the lysine residue.

(22kD): 22kD PEG linked to the cysteine residue.

(43 kD): 43 kD PEG linked to the cysteine residue.

Example 4***Preparation of RINm5F cell membranes***

[94] Flasks of RINm5F cells were washed with PBS, scraped in 20 mM Hepes-1 mM EDTA-250 mM sucrose buffer containing protease inhibitors (HES) and homogenized in a dounce homogenizer followed by repeated resuspension through a 23 gauge needle. Unbroken cells and nuclei were removed by centrifugation at 500xg for 5 minutes. The pellet was resuspended in HES buffer using a 23 gauge needle and the centrifugation was repeated. The supernatants from the two spins were combined and centrifuged at 40,000xg for 20 min. The resulting plasma membrane pellet was resuspended in HES buffer using a 23 gauge needle followed by a 25 gauge needle. Membranes were stored at -80°C until use.

Example 5***Preparation of plasma membranes from rat liver***

[95] Rats were sacrificed and livers removed into ice cold TES buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 255 mM sucrose containing protease inhibitors). The wet weight of the livers was determined and the tissue minced in 5 volumes of ice cold TES buffer and a slurry prepared using a polytron. All buffers and spins were kept at 4°C. The slurry was further homogenized using three strokes of a handheld dounce homogenizer. The homogenate was passed through several layers of cheesecloth and spun at 25,000 x g for 10 minutes. Pellets were homogenized in 22.1 ml TES buffer using 10 strokes of a handheld dounce homogenizer. Twenty-seven point nine milliliters of 2.4 M sucrose in TE was added and mixed well. The homogenate was distributed among several tubes, and each tube was overlaid with 7 ml of TES buffer. The tubes were spun at 120,000 x g for 60 minutes. The plasma membranes were removed from the interface that formed during the spin, diluted in TES and concentrated using a 15 minute spin at 200,000 x g. The resulting pellet was again homogenized in 9.8 ml TES buffer, combined with 10.3 ml 2.4M sucrose, overlaid with 7 ml TES, and centrifuged at 180,000 x g for 30 min. The plasma membranes were removed from the interface, diluted with TES buffer, and collected by centrifugation at 200,000 x g for 15 min. The final pellet was resuspended in TES. Plasma membranes were stored at -80°C until ready for use.

Example 6

Preparation of rat hepatocytes

[96] Hepatocytes were isolated according to a modified procedure of Berry and Friend (*J. Cell. Biol.* 43:506, 1969). A fed male Wistar rat was anesthetized with sodium pentobarbital (55 mg/kg, i.p.). The rat was placed on its back on the tray of the liver perfusion apparatus (37°C), and its limbs were secured with laboratory tape. The ventral surface was cleaned with 70% alcohol, and the abdominal cavity was opened with scissors to expose the liver, portal vein, hepatic artery and the posterior vena cava. Ligatures were placed loosely around the three vessels. A cannula was inserted into the portal vein and was secured with the ligature. The hepatic artery and the posterior vena cava below the liver were tied off with the ligatures. The perfusion pump was turned on and the descending aorta was immediately severed to allow the buffer to escape and to exsanguinate the rat. The chest cavity was quickly opened to expose the heart. A cannula was inserted into the superior vena cava through the heart and was secured with a ligature to complete the circulation of buffer through the liver. The liver was perfused with Krebs-Henseleit buffer containing 5 - 10% sheep RBC and under constant 95% O₂/5% CO₂ flow *in situ* at a flow rate of 14 ml/minute. It was perfused in a non-circulating system for 5 min and then followed by a re-circulating system (with 30mg collagenase) for another 30 minutes. The liver was then removed, minced with scissors in a plastic beaker and filtered through a nylon sieve. The hepatocytes were separated from debris by a series of buffer washings and centrifugations (690 rpm, room temperature, 90 sec). An aliquot of cells was diluted with buffer, stained with 0.4% Trypan Blue and counted. The rest of the cells were diluted with buffer to a density appropriate for each assay.

Example 7

Protocol for rat islet isolation

[97] Sprague Dawley rats (275-320 g) were used as the source of donor islets. Briefly, the pancreas was filled with 10 ml of cold reconstituted Liberase RI (Boehringer Mannheim), harvested and incubated with additional 5 ml enzyme solution in water bath for 30 minutes. Tissue suspension was washed twice with cold 10% FBS/Hanks buffer (Gibco), resuspended in 8 ml 25% ficoll (Sigma) and then layered with 5 ml each of 23%,

20% and 11% ficoll. The islets in the 20% layer after centrifugation were removed, washed twice with cold 10% FBS/Hank buffer and resuspended in 10% FBS/RPMI 1640 media (Sigma).

Example 8

Competitive binding of peptide to the GLP-1 receptor in RINm5F cell plasma membranes

[98] IC_{50} values for the competitive binding of polypeptides and polypeptide fragments, variants, and analogs of the invention to the GLP-1 receptor in RINm5F membranes typically are at least about 0.01 nM up to about 20 nM (*i.e.*, 0.01, 0.1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20 nM). IC_{50} values for polypeptide derivatives of the invention typically are at least 0.01 nM up to about 500 nM (*i.e.*, 0.01, 0.1, 1, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, or 500 nM).

[99] Competitive binding of some polypeptides of the invention to RINm5F cell plasma membranes was measured as follows. Ninety-six-well GF/C filtration plates (Millipore, Bedford, MA) were blocked with 0.3% PEI for at least one hour and washed twice with binding buffer consisting of 20 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7.5, 1 mg/ml BSA, and 1 mg/ml bacitracin. Five micrograms of RINm5F cell plasma membranes diluted in binding buffer were applied to each well together with 0.05 μ Ci ^{125} I labeled GLP-1 and peptide concentrations ranging from 1×10^{-12} to 1×10^{-5} M. Following a 60 minute incubation at room temperature, the plates were washed 3 times with ice-cold PBS containing 1 mg/ml BSA. The plates were dried, scintillant was added to each well, and cpm per well determined using a Wallac Microbeta counter.

[100] The number of ^{125} I counts bound to the membranes at each concentration of peptide were plotted and analyzed by nonlinear regression using Prism software to determine the IC_{50} . The polypeptides disclosed in Table 2 bound to the GLP-1 receptor present in the plasma membranes isolated from RINm5F cells with IC_{50} values of between 1.4 nM and 248 nM (determined from a minimum of three trials). IC_{50} is the concentration of a polypeptide at which maximal binding of labeled GLP-1 (7-36) (SEQ ID NO:2) is reduced by 50%.

Example 9***Competitive binding of peptide to the glucagon receptor in rat liver plasma membranes***

[101] IC_{50} values for the competitive binding of polypeptides and polypeptide fragments, derivatives, variants, and analogs of the invention to the glucagon receptor in rat liver membranes typically are at least about 0.1 nM up to about 1000 nM (*i.e.*, 0.1, 1, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, or 1000 nM).

[102] Competitive binding of some polypeptides of the invention to rat liver plasma membranes was measured as follows. Ninety-six-well GF/C filtration plates (Millipore, Bedford, MA) were blocked with 0.1% PEI for at least one hour and washed twice with binding buffer consisting of 20 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7.5, 1 mg/ml BSA, and 1 mg/ml bacitracin. Three micrograms of rat liver plasma membranes diluted in binding buffer were applied per well together with 0.05 μ Ci ^{125} I labeled glucagon and peptide concentrations ranging from 1×10^{-12} to 1×10^{-5} M. Following a 60 minute incubation at room temperature, the plates were washed 3 times with ice-cold PBS containing 1 mg/ml BSA. The plates were dried, scintillant was added to each well, and cpm per well determined using a Wallac Microbeta counter.

[103] The number of ^{125} I counts bound to the membranes at each concentration of peptide were plotted and analyzed by nonlinear regression using Prism software to determine the IC_{50} . The polypeptides disclosed in Table 2 bound to the glucagon receptor present in the plasma membranes isolated from rat liver with IC_{50} values of between 11.7 nM and 726 nM (determined from a minimum of three trials). IC_{50} is the concentration of a polypeptide at which maximal binding of labeled glucagon is reduced by 50%.

Example 10***Measurement of peptide signaling through GLP-1 receptor using cyclic AMP scintillation proximity assay (SPA)***

[104] For polypeptides and polypeptide fragments, variants, and analogs of the invention, "activation" of the GLP-1 receptor in a cAMP scintillation proximity assay is induction of

a maximal activity that is at least about 80% up to about 200% (*i.e.*, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, or 200%) of the maximal activity induced by the native GLP-1(7-36) (SEQ ID NO:2) with a relative potency of at least 4% up to about 1000% (*i.e.*, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, or 1000%). For polypeptide derivatives of the invention, "activation" of the GLP-1 receptor in a cAMP scintillation proximity assay is induction of a maximal activity that is at least about 80% up to about 200% (*i.e.*, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, or 200%) of the maximal activity induced by the native GLP-1(7-36) (SEQ ID NO:2) with a relative potency of at least 0.5% up to about 1000% (*i.e.*, 0.5, 1, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, or 1000%). "Relative potency" is the EC_{50} of native GLP-1(7-36) (SEQ ID NO:2) divided by the EC_{50} of a polypeptide of the invention, multiplied by 100. " EC_{50} " is the concentration of a polypeptide at which 50% of the maximal activity is achieved.

[105] Peptide signaling of GLP-1 receptor for some polypeptides of the invention using cAMP scintillation proximity assay was measured as follows. RINm5F cells were plated in 96-well plates (Costar) at 1.5×10^5 cells/well and grown at 37°C for 24 hours in RPMI 1640, 5% FBS, antibiotic/antimycotic (Gibco BRL). The media was removed and the cells were washed twice with PBS. The cells were incubated with peptide concentrations ranging from 1×10^{-12} to 1×10^{-5} M in Hepes-PBS containing 1% BSA and 100 μ M IBMX for 15 min at 37°C. For assay of peptides conjugated with fatty acid, the BSA was omitted from the incubation buffer. The incubation buffer was removed, and the cells were lysed in the lysis reagent provided with the cAMP Scintillation Proximity Assay (SPA) direct screening assay system (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ). The amount of cAMP (in pmol) present in the lysates was determined following instructions provided with this kit.

[106] The amount of cAMP (in pmol) produced at each concentration of peptide was plotted and analyzed by nonlinear regression using Prism software to determine the EC_{50} for each peptide. The average relative potency value for GLP-1 receptor activation for the polypeptides disclosed in Table 2 was between 0.6% and 76.1%. The maximum activity

induced ranged from 83% to 132% of the native peptide GLP-1(7-36) (SEQ ID NO:2) (determined from a minimum of three trials). See Table 4.

Example 11

Measurement of peptide signaling through glucagon receptor using cyclic AMP scintillation proximity assay (SPA)

[107] For polypeptides and polypeptide fragments, variants, and analogs of the invention, "activation" of the glucagon receptor in a cAMP scintillation proximity assay is induction of a maximal activity that is at least about 0% up to about 75% (*i.e.*, 0, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, or 75%) of the maximal activity induced by the native glucagon (SEQ ID NO:1) with a relative potency from at least about 0.001 to about 5% (*i.e.*, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 2, 3, 4, or 5%). For polypeptide derivatives of the invention, "activation" of the glucagon receptor in a cAMP scintillation proximity assay is induction of a maximal activity that is at least about 0% to about 40% (*i.e.*, 0, 1, 10, 20, 30, or 40%) of the maximal activity induced by the native glucagon (SEQ ID NO:1) with a relative potency of at least about 0.001 to about 1% (*i.e.*, 0.001, 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, or 1%). "Relative potency" is the EC_{50} of native glucagon (SEQ ID NO:1) divided by the EC_{50} of a polypeptide of the invention, multiplied by 100. " EC_{50} " is the concentration of a polypeptide at which 50% of the maximal activity is achieved.

[108] Peptide signaling of glucagon receptor for some polypeptides of the invention using cAMP scintillation proximity assay was measured as follows. Freshly isolated rat hepatocytes were plated in 96 well plates at 7.5×10^4 or 2×10^5 cells/well in Hepes-bicarbonate-PBS containing 1% BSA and 100 μ M IBMX. Following equilibration at 37°C in a 5% CO₂/95% O₂ environment for 10 min, peptide at concentrations ranging from 1×10^{-12} to 1×10^{-5} M was added for an additional 15 min. The plates were centrifuged briefly, the incubation buffer was removed, and the cells were lysed in lysis reagent provided with the cAMP Scintillation Proximity Assay (SPA) direct screening assay system (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ).

[109] The amount of cAMP (in pmol) present in the lysate was determined following instructions provided with this kit. The amount of cAMP (in pmol) produced at each

concentration of peptide was plotted and analyzed by nonlinear regression using Prism software to determine the EC_{50} for each peptide. The average relative potency value (ratio of the glucagon concentration to polypeptide concentration at 50% response (EC_{50}) $\times$ 100, determined from a minimum of three trials) for glucagon receptor activation for polypeptides of the invention was $<5\%$. The maximum activity induced ranged from 28.3% to 71.3% of the native peptide glucagon (determined from a minimum of three trials).

[110] The ability of the hybrid peptide to inhibit glucagon activity was measured as follows: Following equilibration at 37°C in a $5\% \text{CO}_2/95\% \text{O}_2$ environment for 10 min, $10 \mu\text{M}$ peptide was added to the cells followed immediately by a submaximal concentration of glucagon for 15 min. The cells were lysed and cAMP determined as described above.

[111] After subtracting the amount of cAMP produced in the unstimulated hepatocytes from each data point, the percent inhibition was calculated as follows: Percent inhibition is the amount of cAMP produced in the presence of submaximal glucagon alone less the amount of cAMP produced in the presence of submaximal glucagon and $10 \mu\text{M}$ peptide, divided by the amount of cAMP produced in the presence of submaximal glucagon alone and multiplied by 100. The average percent inhibition of glucagon activity by the polypeptides disclosed in Table 2 was between 11.3% and 59% (determined from a minimum of three trials). See Table 4.

Example 12

Measurement of glucose release from rat hepatocytes

[112] Inhibition of glucagon-mediated glucose production as measured by glucose release from rat hepatocytes is typically at least about 20% inhibition to about 100% inhibition (*i.e.*, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, or 100%).

[113] Inhibition of glucagon mediated glucose production by some polypeptides of the invention was measured as follows. Rat hepatocytes were added into a flat bottom 96 well plate ($2 \times 10^5/100 \mu\text{l/well}$) and pre-incubated in a 37°C incubator with constant shaking and

under 95% O₂/5% CO₂ flow for 10 minutes. Hepatocytes were incubated for another 30 minutes after addition of glucagon with or without peptide. Cells were then lysed with 15% perchloric acid and plates were spun at 2600 rpm, 4°C for 15 min. The supernatant was neutralized with 1M Tris-HCl (pH 8.0): 2.5 N KOH (45:55) and spun again. The resulting supernatant was analyzed for glucose with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (Methods of Enzymatic Analysis, H.U. Bermeier, Ed., Academic Press) and the A₃₄₀ read on a fMAX plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

[114] Glucose output was calculated after subtracting the amount of glucose produced in the unstimulated hepatocytes from each data point and the percent inhibition was calculated. Percent inhibition is the amount of glucose produced in the presence of 1 nM glucagon alone less the amount of glucose produced in the presence of 1 nM glucagon and 100 nM peptide, divided by the amount of glucose produced in the presence of 1nM glucagon alone and multiplied by 100. The polypeptide having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:6 inhibited glucagon mediated glucose production by 47% as determined from 3 trials. See Table 2.

Example 13

Measurement of insulin secretion by perfused rat islets

[115] Increase of insulin secretion by perfused rat islets in this assay is an increase of at least 1.5-fold. The GLP-1 receptor agonist component of polypeptides of the invention increases insulin secretion from perfused islets by at least 1.5-fold to about 10-fold (*i.e.*, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, or 10-fold).

[116] Insulin secretion of perfused rat islets mediated by some peptides of the invention was measured as follows. The bi-phasic responses of insulin release stimulated by these polypeptides were tested by islet perfusion. Fifty islets were loaded in the perfusion chamber and perfused with HEPES-KRB containing 3 mM glucose at 37°C. After 60 min, islets were exposed to buffer containing 8 mM glucose with or without peptide (50 nM) and perfused for another 30 min. Fractions of perfusate were collected at 1 or 5 minute intervals for insulin determination. Insulin was measured using an ELISA kit (Alpco Diagnostics, Windham, NH). At a concentration of 50 nM, the polypeptide having

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:6 increased insulin secretion from perfused islets approximately 2-fold, which is equivalent to that achieved by 50 nM GLP-1.

Example 14

Insulin secretion from dispersed rat islet cells

[117] Increase of insulin secretion from dispersed rat islet cells, in this assay, is an increase of at least 1.5-fold. The GLP-1 receptor agonist component of such polypeptides of the invention increases insulin secretion from dispersed islet cells by at least 1.5-fold to about 10-fold (*i.e.*, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, or 10-fold).

[118] Insulin secretion of dispersed rat islets mediated by a number of peptides of the invention was measured as follows. Islets of Langerhans were isolated from SD rats (200-250g) through a digestion procedure using collagenase. Dispersed islet cells were prepared through treatment with trypsin, seeded into 96 V-bottom plates and pelleted. Cells were cultured overnight in media. Media was aspirated and the cells were pre-incubated with Krebs-Ringer-HEPES buffer containing 3mM glucose for 30 minutes at 37°C. Pre-incubation buffer was removed and cells were stimulated with Krebs-Ringer-HEPES buffer containing the appropriate glucose concentration (*e.g.*, 8 mM), with and without peptides for an appropriate time at 37°C. In some studies, an appropriate concentration of GLP-1 also is included. A portion of supernatant was removed and its insulin content was measured by SPA. The results are expressed as fold over control (FOC). At a concentration of 50 nM, the polypeptide having an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:27 increased insulin secretion from dispersed islet cells approximately 3-fold. See Table 2.

Example 15

Measuring glucagon-stimulated glucose production in fed Wistar rats

[119] Inhibition of glucagon-stimulated glucose production in this assay is an inhibition of at least 20%. The glucagon receptor antagonist component of polypeptides of the invention inhibits glucagon-mediated elevation in blood glucose as measured by glucagon

stimulated glucose production in fed Wistar rats is at least 20% inhibition to about 100% inhibition (*i.e.*, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, or 100%).

[120] Glucagon stimulated glucose production in fed Wistar rats by some polypeptides of the invention was measured as follows. Male Wistar rats were briefly anesthetized with isoflurane gas, tail bled for blood glucose using a Glucometer, and then given an injection into the tail vein of either vehicle (0.9% saline + 1% human albumin), 0.29nmol/kg glucagon, 1nmol/kg polypeptides of the invention or glucagon + polypeptides of the invention. The anesthesia was withdrawn and the conscious rats were tail-bled again after 10, 20 and 30 min.

[121] Glucose inhibition was determined by analyzing the area under the glucose curve after subtracting the basal glucose level (dAUC). Percent inhibition is defined as the amount of glucose produced by 0.3 nmol/kg glucagon alone less the amount of glucose produced by 0.3 nmol/kg glucagon in the presence of 1 nmol/kg hybrid peptide, divided by the amount of glucose produced by 0.3 nmol/kg glucagon alone and multiplied by 100.

[122] Glucagon alone elevated blood glucose levels whereas polypeptides of the invention alone had no effect on blood glucose levels. The polypeptide having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:6 inhibited glucagon-mediated elevation in blood glucose by 63%. See Table 2.

Example 16

Measuring glucagon-stimulated glucose production in fed Balb/C mice

[123] Inhibition of glucose production in this assay is an inhibition of at least about 20%. Preferably, the glucagon receptor antagonist component of polypeptides of the invention inhibits glucagon-mediated elevation in blood glucose in mice as measured by glucagon-stimulated glucose production in fed Balb/C mice by about 20% to about 100%, (*i.e.*, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, or 100%).

[124] Glucagon stimulated glucose production in fed Balb/C mice by some polypeptides of the invention was measured as follows. Fed male Balb/C mice were given vehicle

(0.9% saline + 1% human albumin) or 100 μ g/kg derivatized polypeptide by subcutaneous injection 17 hours prior to the glucagon challenge. The next day the mice were fasted for 2 hours before receiving an intravenous injection of 10 μ g/kg glucagon or vehicle in the tail vein. The mice were tail bled for glucose using a Glucometer just prior to the glucagon injection and again 15 minutes afterward.

[125] The change in glucose over the 15 minutes was calculated for each mouse. Then the average change in glucose in the vehicle-treated group was subtracted from the change in glucose for each mouse in the treated groups to obtain the change in glucose due to glucagon. Percent inhibition is defined as the amount of glucose produced by 10 μ g/kg glucagon alone less the amount of glucose produced by 10 μ g/kg glucagon in the presence of 100 μ g/kg hybrid peptide, divided by the amount of glucose produced by 100 μ g/kg glucagon alone and multiplied by 100. See Table 3

Table 3

Group	Glucose (mg/dl)				% of 10µg/kg Glucagon	% Inhibition
	0 min	15 min	Delta (15-0)	-Vehicle delta		
Vehicle	92	108	16			
10µg/kg glucagon	95	195	100	84	100	
10µg/kg glucagon + 100µg polypeptide (SEQ ID NO:27)	75	150	75	59	69	31

Example 17***Measuring increases in plasma insulin levels during in vivo glucose tolerance testing (IVGTT) in fasted Wistar rats***

[126] An increase in plasma insulin levels in this assay is an increase of at least about 2-fold. Preferably, the GLP-1 receptor agonist component of polypeptides of the invention increases insulin secretion in rats as measured by an increase in plasma insulin levels during *in vivo* glucose tolerance testing in fasted Wistar rats by about 2-fold to about 5-fold, more preferably by about 2-fold to about 10-fold, and still more preferably by about 2-fold to about 20-fold (*i.e.*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20-fold).

[127] Plasma insulin levels during *in vivo* glucose tolerance testing in fasted Wistar rats by some polypeptides of the invention were measured as follows. Male Wistar rats were fasted overnight and then anesthetized with isoflurane gas. The rats were given a tail vein injection of 0.4g/kg of glucose plus either vehicle (0.9% saline + 1% albumin) or 1nmol/kg GLP-1 (positive control) or 1nmol/kg of polypeptides of the invention. The rats were eye-bled one minute later and the plasma assayed for insulin using an ELISA Kit (Alpco Diagnostics (Windham, NH)). At a concentration of 1 nmol/kg, the polypeptide having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:6 promoted insulin secretion 3-4 fold, which is equivalent to that achieved by 1 nmol/kg GLP-1. See Table 2.

Example 18***Effect of peptides of the invention on intraperitoneal glucose tolerance testing (IPGTT) in rats or mice***

[128] A decrease in blood glucose levels as measured by this assay is a decrease of at least about 10%. Preferably, the GLP-1 receptor agonist component of polypeptides of the invention decreases blood glucose levels in rats or mice as measured by intraperitoneal glucose tolerance testing in rats or mice by about 10% to about 60%, more preferably by about 10% to about 80%, still more preferably by about 10% to about 100% (*i.e.*, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, or 100%).

[129] Blood glucose levels during intraperitoneal glucose tolerance testing in rats or mice by some polypeptides of the invention were measured as follows. The *in vivo* activity of the polypeptides of the invention when administered subcutaneously was examined in rats or mice. Rats or mice fasted overnight were given a subcutaneous injection of control or peptide (100 µg/kg). Basal blood glucose was measured prior to administration of peptides or three or 17 hours after administration of derivatized peptides, and the rats or mice were given 2g/kg of glucose intraperitoneally. Blood glucose was measured again after 15, 30 and 60 minutes in rats or 30 and 60 minutes in mice.

[130] Peptides of the invention significantly reduced blood glucose levels relative to the vehicle following the IPGTT, with 13%-54% reduction in the glucose AUC. This demonstrates that peptides have prolonged glucose lowering activity and a prolonged half-life *in vivo*. GLP-1 has a very short half-life *in vivo* (< 10 min.). The ability of the peptides of the invention to lower blood glucose 3 hours following peptide administration is a clear indication that the peptide is present in the circulation at this time point and hence has prolonged half-life relative to GLP-1.

Example 19***Peptide PEGylation***

[131] PEGylation can be performed by any method known to those skilled in the art. However, in this instance, PEGylation was performed by introducing a unique cysteine mutation into the peptide followed by PEGylating the cysteine via a stable thioether

linkage between the sulfhydryl of the peptide and maleimide group of the methoxy-PEG-maleimide reagent (Inhale/Shearwater). It is preferable to introduce the unique cysteine at the C-terminus of the peptide to minimize potential reduction of activity by PEGylation.

[132] Specifically, a 2-fold molar excess of mPEG-mal (MW 22kD and 43kD) reagent was added to 1 mg of peptide (*e.g.*, SEQ ID NO:25 having a cysteine mutation at the C-terminus of the peptide) and dissolved in reaction buffer at pH 6 (0.1M Na phosphate/ 0.1M NaCl/ 0.1M EDTA). After 0.5 hour at room temperature, the reaction was stopped with 2-fold molar excess of DTT or free cysteine to mPEG-mal. The peptide-PEG-mal reaction mixture was applied to a cation exchange column to remove residual PEG reagents followed by gel filtration column to remove residual free peptide. The purity, mass, and number of PEGylated sites were determined by SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. PEGylation with a smaller PEG (*e.g.*, a linear 22 kD PEG) will less likely reduce activity of the peptide, whereas a larger PEG (*e.g.*, a branched 43kD PEG) will more likely reduce activity. However, the larger PEG will increase plasma half life further so that once a week injection may be possible (Harris, *et al.*, PEGylation: A Novel Process for Modifying *Pharmacokinetics*, *Clin. Pharmacokinet* 40:539-551, 2001).

Example 20

Relative potency of GLP-1 receptor agonist and glucagon receptor antagonist polypeptides

[133] GLP-1 binding (IC_{50} values) for polypeptides listed in Table 4 was determined as described in Example 8. Relative potency values and percent GLP-1 activity were calculated as described in Example 10. Rats or mice were dosed with 100 μ g/kg peptide and 3 hours post-dosing the decrease in glucose levels were determined by intraperitoneal glucose tolerance testing (IPGTT) as described in Example 18. See Table 4.

[134] Liver membrane binding (IC_{50} values) for polypeptides listed in Table 4 were determined as described in Example 9. Percent inhibition of glucagon stimulated cAMP increase was determined as described in Example 11. Rats or mice were dosed with 100 μ g/kg peptide and 17 hours post-dosing glucose levels were determined by the methods of Examples 15 and 16 and reported in Table 4. Polypeptides of the invention function as GLP-1 receptor agonists and glucagon receptor antagonists *in vivo*.

Table 4

peptide	GLP1				Glucagon			
	RIN IC50 (nM)	Relative Potency (%)	% GLP1 max	In vivo Decrease IpGTT AUC (%) ^a	Liver IC50 (nM)	% Inhib glucagon stimulated cAMP increase	In vivo % Decrease glucagon stimulated blood glucose ^b	
Glucagon					1.8			
GLP-1	0.4	100	100					
G1	6	6.9	112.1		6.6			
G5	0.5	69.9	109.4		243.1			
G27	2.2	13.4	98.1		69.3	31		
G51	8.2	58.1	91.2		154.1	35.2		
G55	9.8	18.6	115.9		139.2	32.1		
G56	6.6	37.2	114.8		125.3	28.6		
G57	14.7	18.3	132.4		177.5	18.4		
G58	6.9	76.1	99.0		163.5	32.6		
G59	2.1	22.7	101.7		97.5	41.1		
G60	13.8	22.3	95.7		682	21.8		
G61	10.6	12.1	96.0		232	45.2		
G71	5.8	4.3	93.3		25.6	11.3		
G74	4.4	8.4	88.7		21.7	23.7		
G75	7.7	6.6	86.1		54.0	17.1		
G76	10.2	7.7	85		59.1	23.0		
G77	8.9	9.5	92.1		61.1	18.6		
G277	ND	1.8	93.7	46	65.5			
G82	8.1	29.9	97.1		33.6	30.2		
G83	3.2	29.9	89.4		28.6	24.7		
G84	1.4	61.8	113.9		11.7	25.2		
G85	1.5	64.5	95.8		16.1	27.9		
G185	4.5	13.0	103.9		48	32		
G2185	56.1	6.2	112.7	44	347			
G4185	248	0.7	98.3	36	547		31	
G87	98.6	6.1	100.4	13	620	59		
G88	109.0	2.3	118.3	16	350			
G90	25.4	0.8	83.5	13	726			
G182	12.6	1.4	104.4	14	220			
G183	158.7	0.6	90.5	27	663			

a = ipGTT in mice 3 hours post dosing with 100 µg/kg peptide
b = glucagon challenge in mice 17 hours post dosing with 100 µg/kg peptide
ND= not determined

We claim:

- 1. A polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs:6 through 32, and functionally equivalent fragments, derivatives and variants thereof.**
- 2. A polynucleotide encoding a polypeptide sequence of claim 1, or a degenerate variant thereof.**
- 3. A vector comprising a polynucleotide of claim 2.**
- 4. A host cell comprising a vector of claim 3.**
- 5. A method for producing a polypeptide comprising:**
 - a) culturing the host cell of claim 4 under conditions suitable for the expression of said polypeptide; and**
 - b) recovering the polypeptide from the host cell culture.**
- 6. A pharmaceutical composition comprising a polypeptide of claim 1 in combination with a pharmaceutically acceptable carrier.**
- 7. A gene therapy composition comprising a polynucleotide of claim 2 in combination with a therapeutically effective gene therapy vector.**
- 8. The polypeptide of claim 1 wherein said polypeptide is represented by SEQ ID NO:25.**
- 9. The polypeptide of claim 1 wherein said polypeptide is represented by SEQ ID NO:26 .**
- 10. The polypeptide of claim 1 wherein said polypeptide is represented by SEQ ID NO: 27.**
- 11. A purified antibody which binds specifically to the polypeptide of claim 1.**

12. A method of treating a metabolic disorder in a mammal comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a peptide that is a GLP-1 receptor agonist and a glucagon antagonist.
13. The method of claim 12, wherein the peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NOs:6 through 32, and functionally equivalent fragments, derivatives and variants thereof.
14. The method of claim 13, wherein the peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO:26, and SEQ ID NO:27.
15. The method of claim 12 wherein said metabolic disorder is type 2 diabetes.
16. The method of claim 12 wherein said therapeutically effective amount ranges from about 0.1ug/kg to about 1mg/kg.
17. The method of claim 12 wherein said metabolic disorder is the pre-diabetic state of impaired glucose tolerance.

58
57

MSB-7288

**PEPTIDES ACTING AS BOTH GLP-1 RECEPTOR AGONISTS AND GLUCAGON
RECEPTOR ANTAGONISTS AND THEIR PHARMACOLOGICAL METHODS OF
USE**

Abstract of the Invention

The invention provides polypeptides that act both as an agonist of the GLP-1 receptor and an antagonist of the glucagon receptor. Such polypeptides are useful for treating individuals with type 2 diabetes or other metabolic disorders.

59
58

MSB-7288

SEQUENCE LISTING

<110> Pan, Clark

<120> Peptides acting as both GLP-1 receptor agonists and glucagon receptor antagonists and their pharmacological methods of use

<130> 2973.00085

<160> 34

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> AMIDATION

<400> 2

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 3

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

60
59

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Artificial sequence

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)..(30)
 <223> AMIDATION

<400> 4

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 5
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Artificial sequence

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)..(30)
 <223> AMIDATION

<400> 5

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 6
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Artificial sequence

61
60

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30)..(30)
<223> AMIDATION

<400> 6

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 7
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 7

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 8
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial sequence

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30)..(30)
<223> AMIDATION

<400> 8

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 9

62
61

MSB-7288

<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial sequence

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30)..(30)
<223> AMIDATION

<400> 9

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Ala Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 10
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial sequence

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30)..(30)
<223> AMIDATION

<400> 10

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Ala Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 11
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 11

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 12
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 12

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 13
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 13

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Ala Lys Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 14
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 14

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Ala Lys Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 15

<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 15

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Cys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 16
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 16

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Cys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 17
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 17

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Cys Arg Gly
20 25 30

<210> 18
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 18

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Cys Gly
20 25 30

<210> 19

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial sequence

<400> 19

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Cys
20 25 30

<210> 20

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial Sequence

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> PEGylation

<400> 20

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Cys
20 25 30

<210> 21

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial sequence

66
65

<400> 21

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 22

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial sequence

<400> 22

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 23

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial sequence

<400> 23

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial sequence

<400> 24

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Lys
20 25 30

<210> 25
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial sequence

<400> 25

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Cys
20 25 30

<210> 26
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> PEGylation

<400> 26

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Cys
20 25 30

<210> 27
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artifical Sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> PEGylation

68
67

MSB-7288

<400> 27

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Cys
20 25 30

<210> 28
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial sequence

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30)..(30)
<223> AMIDATION

<220>
<221> LIPID
<222> (20)..(20)
<223> PALMITATE

<400> 28

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 29
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial sequence

<220>
<221> LIPID
<222> (31)..(31)
<223> PALMITATE

<400> 29

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Lys
 20 25 30

<210> 30
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Artificial sequence

<220>
 <221> LIPID
 <222> (24) .. (24)
 <223> PALMITATE

<400> 30

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 31
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Artificial sequence

<220>
 <221> LIPID
 <222> (32) .. (32)
 <223> PALMITATE

<400> 31

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Lys
 20 25 30

<210> 32
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Artificial sequence

<220>
 <221> LIPID
 <222> (24) .. (24)
 <223> PALMITATE

<400> 32

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 33
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Artificial Sequence

<400> 33

Ile Glu Gly Arg His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys
 1 5 10 15

Tyr Leu Asp Ala Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys
 20 25 30

Gly Arg Gly
 35

<210> 34
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Artificial Sequence

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11) .. (12)
 <223> X11 = R, G, S, A, K, or T
 X12 = K, N, R, A, S, H, or Q

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16) .. (18)
 <223> X16 = A, F, S, W, T, H, K, R, V, I, L, M, N, Q, G, or Y
 X17 = R, A, L, M, V, Q, K, F, I, W, N, D, E, H, S, T, G, or Y
 X18 = K, R, F, I, L, Y, V, M, A, G, or H

21
70

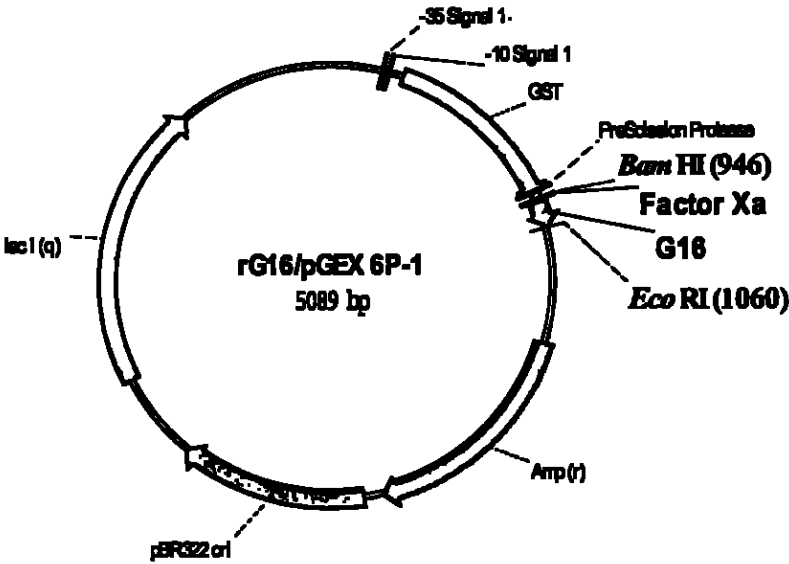
MSB-7288

<400> 34

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Xaa Xaa Tyr Leu Asp Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

FIGURE 1



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference MSB-7288-PCT	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US02/31693	International filing date (day/month/year) 04 October 2002 (04.10.2002)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 05 October 2001 (05.10.2001)
Applicant BAYER CORPORATION		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report

a. With regard to the language, the International search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:



contained in the international application in written form.



filed together with the international application in computer readable form.



furnished subsequently to this Authority in written form.



furnished subsequently to this Authority in computer readable form.



the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.



the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☒ Unity of invention is lacking (See Box II).

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1



as suggested by the applicant.



because the applicant failed to suggest a figure.



because this figure better characterizes the invention.



None of the figures

74
73

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/31693

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1, 5, 6, 8-10 and 12-17

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

35
74

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/31693

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C07K 16/00; A01N 37/18; C12P 21/06; C12N 15/00; C12Q 1/68
US CL : 530/324, 387.9; 514/2; 435/69.1, 320.1, 6

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 530/324, 387.9; 514/2; 435/69.1, 320.1, 6

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91/11457 (BUCKLEY et al) 08 August 1991 (08.08.1991), abstract, claims 1, 7, p. 29	1, 6, 10, 12-16
—	lines 10-20	
Y		17
Y	US 6,232,310 B1 (HANSEN et al.) 15 May 2001 (15.05.2001), col. 1, lines 20-40.	17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

Special categories of cited documents:	
"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to undermine the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reasons (as specified)	"Y" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 March 2003 (19.03.2003)

Date of mailing of the international search report

01 MAY 2003

Name and mailing address of the ISA/US

Commissioner of Patents and Trademarks

Box PCT

Washington, D.C. 20531

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

Laurie Mayer

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/31693

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1, 5, 6, 8, 9, 10, 12-17, drawn to a polypeptide, a composition comprising a polypeptide and a method of using the polypeptide.

Group II, claim(s) 2-4, 7, drawn to a polynucleotide, a composition comprising a polynucleotide, nucleic acid constructs, and a method of making a polypeptide by recombinant means.

Group III, claim(s) 11, drawn to an antibody.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: These inventions are structurally unrelated chemical compounds and have different functions and uses. The polypeptides may be used in an assay or may be administered to treat infection while the nucleic acid construct may be used to encode a peptide and the antibody may be used to bind to a protein.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are as follows:

SEQ ID NOS: 6-32.

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The claims encompass more than one distinct amino acid sequences with different corresponding primary structures. The proteins are structurally different. As the applicant paid for only one invention, only the first listed sequence, SEQ ID NO: 6 has been searched.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

Dialog (Scisearch, Embase, Medline), West (US patents, US published applications, EP, JP), glucagon-like, GLP, GLP-1, diabetes, impaired glucose tolerance

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference MSB-7288-PCT		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/US02/31693	International filing date (day/month/year) 04 October 2002 (04.10.2002)	Priority date (day/month/year) 05 October 2001 (05.10.2001)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC(7): C07K 16/00; A01N 37/18; C12P 21/06; C12N 15/00; C12Q 1/68 and US Cl.: 530/324, 387.9; 514/2; 435/69.1, 320.1, 6			
Applicant BAYER CORPORATION			
1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet. ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u> </u> sheets.			
3. This report contains indications relating to the following items: I ☒ Basis of the report II ☐ Priority III ☒ Non-establishment of report with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV ☐ Lack of unity of invention V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI ☐ Certain documents cited VII ☐ Certain defects in the international application VIII ☐ Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 01 May 2003 (01.05.2003)		Date of completion of this report 02 January 2004 (02.01.2004)	
Name and mailing address of the IPEA/US Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Robert A. Wax Telephone No. (703) 308-1235	

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet)(July 1998)

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed.
- ☒ the description:
pages 1-41 as originally filed
pages NONE, filed with the demand
pages NONE, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims:
pages 42 and 43 as originally filed
pages NONE, as amended (together with any statement) under Article 19
pages NONE, filed with the demand
pages NONE, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings:
pages 1/1 as originally filed
pages NONE, filed with the demand
pages NONE, filed with the letter of _____.
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages 1-13 as originally filed
pages NONE, filed with the demand
pages NONE, filed with the letter of _____.

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in printed form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☒ the description, pages NONE
- ☒ the claims, Nos. NONE
- ☒ the drawings, sheets/fig NONE

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (rules 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/US02/31693

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The question whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been and will not be examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 2-5, 7-11, 14 as they refer to a sequence other than SEQ ID NO: 6, the first listed SEQ ID NO:

because:

- ☐ the said international application, or the said claim Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 2-5, 7-11, 14

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

79
78

88
79

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/US02/31693

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. STATEMENT

Novelty (N)	Claims <u>17</u>	YES
	Claims <u>1, 6, 12, 13, 15, 16</u>	NO
Inventive Step (IS)	Claims <u>NONE</u>	YES
	Claims <u>1, 6, 12, 13, 15-17</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims <u>1, 6, 12, 13, 15-17</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. CITATIONS AND EXPLANATIONS

Claims 1, 6, 12, 13, 15 and 16 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by WO 91/11457. WO 91/11457 teaches a peptide, GLP-1 (7-36), that is used in the treatment of diabetes Type II and is a functionally equivalent variant of SBQ ID NO: 6 (present claim 1), a pharmaceutical composition comprising the polypeptide in combination with a pharmaceutically acceptable carrier (p. 28, lines 20-23) (present claim 6). WO 91/11457 teaches a method of treating Type II diabetes by administering to a mammal a therapeutically effective amount of this protein (claims 13 and 15) (present claims 12-15).

Claims 1, 6, 12, 13 and 15-17 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over WO 91/11457 in view of Hansen et al. (US 6,232,310). WO 91/11457 teaches a method of treating Type II diabetes by administering to a mammal a therapeutically effective amount of the above-mentioned protein, a GLP-1 receptor agonist and a glucagon antagonist (claims 13 and 15) (present claims 12-15). Hansen et al. teach a method of treating the pre-diabetic state of impaired glucose tolerance by administering a therapeutically effective amount of a peptide that is a GLP-1 receptor agonist and a glucagon antagonist (col. 1, lines 20-40).

Claims 1, 6, 12, 13 and 15-17 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus have industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.

NEW CITATIONS

NONE

84
80



UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office
ASSISTANT SECRETARY AND COMMISSIONER
OF PATENTS AND TRADEMARKS
Washington, D.C. 20231

JUNE 12, 2003

PTAS

BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION
JEFFREY M. GREENMAN
LAW & PATENTS
400 MORGAN LANE
WEST HAVEN, CT 06516

700033150A

700033150A

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 703-308-9723. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, ASSIGNMENT DIVISION, BOX ASSIGNMENTS, CG-4, 1213 JEFFERSON DAVIS HWY, SUITE 320, WASHINGTON, D.C. 20231.

RECORDATION DATE: 06/11/2003

REEL/FRAME: 013724/0591
NUMBER OF PAGES: 2

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:
PAN, CLARK

DOC DATE: 06/02/2003

ASSIGNOR:
WHELAN, JAMES

DOC DATE: 06/06/2003

ASSIGNOR:
CLAIMMONT, KEVIN B.

DOC DATE: 06/06/2003

ASSIGNEE:
BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION
400 MORGAN LANE
WEST HAVEN, CONNECTICUT 06516

SERIAL NUMBER: 10265345
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 10/03/2002
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 10345751
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 01/16/2003
ISSUE DATE:

82
31

013724/0591 PAGE 2

SERIAL NUMBER:
PATENT NUMBER:
PCT NUMBER: US0231693

FILING DATE:
ISSUE DATE:

MARY BENTON, EXAMINER
ASSIGNMENT DIVISION
OFFICE OF PUBLIC RECORDS

06/11/2003
700033150

ATTY. DOCKET: M88-7284

Form PTO-1585 (Rev. 03/01) OMB No. 0851-0027 (exp. 03/12/2003) Tab. settings 555		RECORDATION FORM COVER SHEET PATENTS ONLY		U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE U.S. Patent and Trademark Office	
To the Honorable Commissioner of Patents and Trademarks: Please record the attached original documents or copy thereof.					
1. Name of conveying party(ies): NAME(S): <u>Clark PAN</u> EXECUTION DATE(S): <u>06/02/2003</u> <u>James WHELAN</u> <u>06/06/2003</u> <u>Kevin B. CLAIRMONT</u> <u>06/06/2003</u> Additional name(s) of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No			2. Name and address of receiving party(ies) Name: <u>BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION</u> Internal Address: _____ _____ _____ Street Address: <u>400 MORGAN LANE</u> _____ _____ City: <u>WEST HAVEN</u> State: <u>CT</u> Zip: <u>06516</u> Additional name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No		
3. Nature of conveyance: ☒ Assignment ☐ Merger ☐ Security Agreement ☐ Change of Name ☐ Other _____ Execution Date: <u>- SEE ABOVE -</u>			4. Application number(s) or patent number(s): If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is: _____ A. Patent Application No.(s) <u>10/280,345</u> <u>10/246,781</u> <u>PCT/US02/01883</u> Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No B. Patent No.(s)		
5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed: Name: <u>JEFFREY M. GREENMAN</u> Internal Address: <u>LAW & PATENTS</u> <u>BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION</u> _____ Street Address: <u>400 MORGAN LANE</u> _____ _____ City: <u>WEST HAVEN</u> State: <u>CT</u> Zip: <u>06516</u>			6. Total number of applications and patents involved: <u>3</u> 7. Total fee (37 CFR 3.41):\$ <u>120.00</u> ☐ Enclosed ☒ Authorized to be charged to deposit account 8. Deposit account number: <u>13-3372</u> (Attach duplicate copy of this page if paying by deposit account)		
DO NOT USE THIS SPACE					
9. Statement and signature. To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document. <u>Susan M. Pellegrino</u> Name of Person Signing  Signature <u>June 11, 2003</u> Date Total number of pages including cover sheet, attachments, and documents: <u>3</u>					

CERTIFICATE OF TRANSMISSION UNDER 37 C.F.R. 1.2: I hereby certify that this correspondence and any papers referred to as attached are being transmitted to the US Patent and Trademark Office, Assignment Division, filemark number (700) 330-0992.

Date: JUN 11 2003


Signature of Person Certifying

84
83

ATTY. DOCKET: MSB-7288

Form PTO-1595 (Rev. 03/01) OMB No. 0851-0027 (exp. 5/31/2002) Tab settings ⇌ ⇌ ⇌ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼		RECORDATION FORM COVER SHEET PATENTS ONLY		U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE U.S. Patent and Trademark Office	
To the Honorable Commissioner of Patents and Trademarks: Please record the attached original documents or copy thereof.					
1. Name of conveying party(ies): NAME(S): EXECUTION DATE(S): Clark PAN 06/02/2003 James WHELAN 06/06/2003 Kevin B. CLAIRMONT 06/06/2003 Additional name(s) of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No			2. Name and address of receiving party(ies) Name: <u>BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION</u> Internal Address: _____ _____ _____ Street Address: <u>400 MORGAN LANE</u> _____ _____ City: <u>WEST HAVEN</u> State: <u>CT</u> Zip: <u>06516</u> Additional name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No		
3. Nature of conveyance: ☒ Assignment ☐ Merger ☐ Security Agreement ☐ Change of Name ☐ Other _____ Execution Date: <u>- SEE ABOVE -</u>					
4. Application number(s) or patent number(s): If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is: _____ A. Patent Application No.(s) <u>10/285,345</u> <u>10/345,751</u> <u>PCT/US02/31683</u> Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No B. Patent No.(s) _____ _____					
5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed: Name: <u>JEFFREY M. GREENMAN</u> Internal Address: <u>LAW & PATENTS</u> <u>BAYER PHARMACEUTICALS</u> <u>CORPORATION</u> _____ Street Address: <u>400 MORGAN LANE</u> _____ _____ City: <u>WEST HAVEN</u> State: <u>CT</u> Zip: <u>06516</u>			6. Total number of applications and patents involved: <u>3</u> 7. Total fee (37 CFR 3.41).....\$ <u>120.00</u> ☐ Enclosed ☒ Authorized to be charged to deposit account 8. Deposit account number: <u>13-3372</u> (Attach duplicate copy of this page if paying by deposit account)		
DO NOT USE THIS SPACE					
9. Statement and signature. To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document. _____ Susan M. Pellegrino Name of Person Signing Signature: <u><i>Susan M. Pellegrino</i></u> Date: <u>June 11, 2003</u> Total number of pages including cover sheet, attachments, and documents: <u>2</u>					

CERTIFICATE OF TRANSMISSION UNDER 37 C.F.R. 1.6: I hereby certify that this correspondence and any papers referred to as attached are being facsimile transmitted to the US Patent and Trademark Office, Assignment Division, facsimile number (703) 308-5993.

Date: JUN 11 2003

[Signature]
Signature of Person Certifying

85
84

ASSIGNMENT OF INVENTION

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of the sum of one dollar (\$1.00) and for other good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,

ASSIGNOR(S): (given name followed by family name)	citizen(s) of:	residing at:
Clark PAN	United States of America	22382 Princeton Place Castro Valley, California 94552 US
James WHELAN	Ireland	210 Summer Hill Road Madison, Connecticut 06443 US
Kevin B. CLAIRMONT	United States of America	80 Merwin Circle Cheshire, Connecticut 06410 US

hereby sell(s), assign(s) and transfer(s) to

ASSIGNEE: Bayer Pharmaceuticals Corporation, 400 Morgan Lane, West Haven, CT 06516, U.S.A., and its successors, assigns and legal representatives,

the entire right, title and interest in and to, including the right to claim priority from, the invention(s) disclosed in

U.S. Patent Application No. 10/285,345, filed on October 3, 2002, which is entitled: Peptides Acting as Both GLP-1 Receptor Agonists and Glucagon Receptor Antagonists and Their Pharmacological Methods of Use;

U.S. Patent Application No. 10/345,751, filed on January 16, 2003, which is entitled: Peptides Acting as Both GLP-1 Receptor Agonists and Glucagon Receptor Antagonists and Their Pharmacological Methods of Use; and

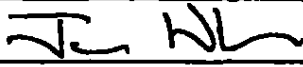
International Application No. PCT/US02/31683, filed on October 4, 2002, which is entitled: Peptides Acting as Both GLP-1 Receptor Agonists and Glucagon Receptor Antagonists and Their Pharmacological Methods of Use

and any legal equivalent thereof in a foreign country,

and in and to all Letters Patent and equivalents thereof to be obtained for said invention in all countries by the above application or any continuation, division, renewal, substitute or equivalent thereof, as well as to any reissue, reexamination, patent term restoration, or equivalent thereto.

ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment, and that ASSIGNEE will, upon ASSIGNEE's request, be provided promptly with all pertinent facts and documents relating to said invention(s) and said Letters Patent and legal equivalents as may be known and accessible to ASSIGNOR, and ASSIGNOR will testify as to the same in any interference, litigation or other proceeding related thereto, and will promptly execute and deliver to ASSIGNEE or its legal representative(s) any and all papers, instruments or affidavits required to apply for, obtain, maintain, issue and enforce said application, said invention(s) and said Letters Patent and said equivalents thereof which may be necessary or desirable to carry out the purposes thereof.

IN WITNESS WHEREOF, I/we have hereunto respectively set hand and seal on the date(s) shown below:

Typed Name of Inventor	Signature of Inventor	Date
Clark PAN		6/2/03
James WHELAN		6/6/03
Kevin B. CLAIRMONT		6/6/03

86
85

PCT REQUEST

MSB-7288-PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 16.12.2002 10:01:04 AM

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.10.2002)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	MSB-7288-PCT
I	Title of invention	PEPTIDES ACTING AS BOTH GLP-1 RECEPTOR AGONISTS AND GLUCAGON RECEPTOR ANTAGONISTS AND THEIR PHARMACOLOGICAL METHODS OF USE
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	BAYER CORPORATION
II-5	Address:	100 Bayer Road Pittsburgh, PA 15205 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	(203) 812-3964
II-9	Facsimile No.	(203) 812-6459
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	PAN, Clark
III-1-5	Address:	22362 Princeton Place Castro Valley, CA 94552 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	WHELAN, James
III-2-5	Address:	210 Summer Hill Road Madison, CT 06443 United States of America
III-2-6	State of nationality	IE
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is:	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	CLAIRMONT, Kevin, B.
III-3-5	Address:	80 Merwin Circle Cheshire, CT 06410 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	GREENMAN, Jeffrey, M.
IV-1-2	Address:	Bayer Corporation 400 Morgan Lane West Haven, CT 06516 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	(203) 812-3964
IV-1-4	Facsimile No.	(203) 812-6459
IV-1-5	Agent's registration No.	26552
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	BREWER, Alice, A.(32888); CHIU, Jerrie, L.(41670); GRAY, William, F.(31018); PELLEGRINO, Susan, M.(48972); SHIMEI, Barbara, A.(29862)

V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE SK TR and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT
V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SC SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW
V-3	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under Items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under Item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.	
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	05 October 2001 (05.10.2001)
VI-1-2	Number	60/327,730
VI-1-3	Country	US

88
88

VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (ISA/US)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	1	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	1	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	1	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

86
89

PCT REQUEST

5/10

MSB-7288-PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 16.12.2002 10:01:04 AM

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)). In a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name:	in relation to this international application BAYER CORPORATION is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1 (i)		BAYER CORPORATION is entitled as employer of the inventor, PAN, Clark
VIII-2-1 (ii)		BAYER CORPORATION is entitled as employer of the inventor, WHELAN, James
VIII-2-1 (iii)		BAYER CORPORATION is entitled as employer of the inventor, CLAIRMONT, Kevin, B.
VIII-2-1 (b)	This declaration is made for the purposes of:	all designations except the designation of the United States of America

91
90

PCT REQUEST

6/10

MSB-7288-PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 18.12.2002 10:01:04 AM

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)): Name:	in relation to this international application BAYER CORPORATION is entitled to claim priority of earlier application No. 60/327,730 by virtue of the following:
VIII-3-1 (i)		BAYER CORPORATION is entitled as employer of the inventor, PAN, Clark
VIII-3-1 (ii)		BAYER CORPORATION is entitled as employer of the inventor, WHELAN, James
VIII-3-1 (b)	This declaration is made for the purposes of:	all designations

82
91

VIII-4-1	Declaration: Inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) Declaration of Inventorship (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:	I hereby declare that I believe I am the original, first and sole (if only one inventor is listed below) or joint (if more than one inventor is listed below) inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought. This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application). I hereby declare that my residence, mailing address, and citizenship are as stated next to my name. I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified international application, including the claims of said application. I have identified in the request of said application, in compliance with PCT Rule 4.10, any claim to foreign priority, and I have identified below, under the heading "Prior Applications," by application number, country or Member of the World Trade Organization, day, month and year of filing, any application for a patent or inventor's certificate filed in a country other than the United States of America, including any PCT international application designating at least one country other than the United States of America, having a filing date before that of the application on which foreign priority is claimed.
VIII-4-1-1	Prior applications:	

98
92

PCT REQUEST

8/10

MSB-7288-PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 16.12.2002 10:01:04 AM

		I hereby acknowledge the duty to disclose information that is known by me to be material to patentability as defined by 37 C.F.R. § 1.56, including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the PCT international filing date of the continuation-in-part application. I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.
VIII-4-1-1-1	Name:	PAN, Clark
VIII-4-1-1-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Castro Valley, California
VIII-4-1-1-3	Mailing address:	22362 Princeton Place
VIII-4-1-1-4	Citizenship:	US
VIII-4-1-1-5	Inventor's Signature: (If not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the International application. The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-1-6	Date: (of signature which is not contained in the request, or of the declaration that is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the International application)	

VIII-4-1-2-1	Name:	WHELAN, James
VIII-4-1-2-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Madison, Connecticut
VIII-4-1-2-3	Mailing address:	210 Summer Hill Road
VIII-4-1-2-4	Citizenship:	IE
VIII-4-1-2-5	Inventor's Signature: (If not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 28ter after the filing of the International application. The signature must be that of the Inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-2-6	Date: (of signature which is not contained in the request, or of the declaration that is corrected or added under Rule 28ter after the filing of the International application)	
VIII-4-1-3-1	Name:	CLAIRMONT, Kevin, B.
VIII-4-1-3-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Cheshire, Connecticut
VIII-4-1-3-3	Mailing address:	80 Merwin Circle
VIII-4-1-3-4	Citizenship:	US
VIII-4-1-3-5	Inventor's Signature: (If not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 28ter after the filing of the International application. The signature must be that of the Inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-3-6	Date: (of signature which is not contained in the request, or of the declaration that is corrected or added under Rule 28ter after the filing of the International application)	

98
94

PCT REQUEST

10/10

MSB-7288-PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 18.12.2002 10:01:04 AM

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	10	-
IX-2	Description	41	-
IX-3	Claims	2	-
IX-4	Abstract	1	EZABST00.TXT
IX-5	Drawings	1	-
IX-7	TOTAL	55	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-6	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-EASY diskette	-	Diskette
IX-18	Figure of the drawings which should accompany the abstract	1	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	CHIU, Jerrie, L.	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/US
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the international Bureau	
------	--	--

96
95

PCT REQUEST

MSB-7288-PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 04.10.2002 08:56:27 AM

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/ROH01 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.06.2002)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	MSB-7288-PCT
I	Title of invention	PEPTIDES ACTING AS BOTH GLP-1 RECEPTOR AGONISTS AND GLUCAGON RECEPTOR ANTAGONISTS AND THEIR PHARMACOLOGICAL METHODS OF USE
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	BAYER CORPORATION
II-5	Address:	800 Dwight Way P. O. Box 1986 Berkeley, CA 94701 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	510 705-7901
II-9	Facsimile No.	510 705-7904
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	PAN, Clark
III-1-5	Address:	22362 Princeton Place Castro Valley, CA 94552 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

94
96

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 04.10.2002 08:56:27 AM

MSB-7285-PCT

III-3	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	WHELAN, James
III-2-5	Address:	210 Summer Hill Road Madison, CO 06443 United States of America
III-2-8	State of nationality	IE
III-2-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	MAHONEY, John, W.
IV-1-2	Address:	Bayer Corporation 800 Dwight Way P. O. Box 1986 Berkeley, CA 94701 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	510 705-7725
IV-1-4	Facsimile No.	510 705-7904
IV-1-5	e-mail	john.mahoney.b@bayer.com
IV-1-5	Agent's registration No.	44,892
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AP: GR GM KE LS MW ME SD SL SZ TZ UG ZW and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT EP: AT BN BG CH LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE SK TR and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT

28
97

V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZW
V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.8(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-8 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.	
V-8	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	05 October 2001 (05.10.2001)
VI-1-2	Number	60/327,730
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority claim of earlier national application	
VI-2-1	Filing date	06 September 2002 (06.09.2002)
VI-2-2	Number	60/408,288
VI-2-3	Country	US
VI-3	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1, VI-2
VII-1	International Searching Authority Chosen	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (ISA/US)

99
98

PCT REQUEST

MSB-7288-PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 04.10.2002 08:58:27 AM

VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	1	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

100
99

VIII-4-1	Declaration: Inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) Declaration of Inventorship (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:	I hereby declare that I believe I am the original, first and sole (if only one inventor is listed below) or joint (if more than one inventor is listed below) inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought. This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application). I hereby declare that my residence, mailing address, and citizenship are as stated next to my name. I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified international application, including the claims of said application. I have identified in the request of said application, in compliance with PCT Rule 4.10, any claim to foreign priority, and I have identified below, under the heading "Prior Applications," by application number, country or Member of the World Trade Organization, day, month and year of filing, any application for a patent or inventor's certificate filed in a country other than the United States of America, including any PCT international application designating at least one country other than the United States of America, having a filing date before that of the application on which foreign priority is claimed.
VIII-4-1 -1	Prior applications:	

101
100

8/0

PCT REQUEST

MSB-7288-PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 04.10.2002 08:58:27 AM

		I hereby acknowledge the duty to disclose information that is known by me to be material to patentability as defined by 37 C.F.R. § 1.56, including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the PCT international filing date of the continuation-in-part application. I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.
VIII-4-1 -1-1	Name:	PAN, Clark
VIII-4-1 -1-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Castro Valley, California
VIII-4-1 -1-3	Mailing address:	22362 Princeton Place Castro Valley, CA 94552 United States of America
VIII-4-1 -1-4	Citizenship:	US
VIII-4-1 -1-5	Inventor's Signature: (If not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application. The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1 -1-6	Date: (of signature which is not contained in the request, or of the declaration that is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application)	

102
11

PCT REQUEST

MSS-7288-PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 04.10.2002 08:58:27 AM

VIII-4-1 -2-1	Name:	WHELAN, James
VIII-4-1 -2-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Madison, Colorado
VIII-4-1 -2-3	Mailing address:	210 Summer Hill Road Madison, CO 06443 United States of America
VIII-4-1 -2-4	Citizenship:	IE
VIII-4-1 -2-5	Inventor's Signature: (If not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 28ter after the filing of the international application. The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1 -2-6	Date: (of signature which is not contained in the request, or of the declaration that is corrected or added under Rule 28ter after the filing of the international application)	

103
102

PCT REQUEST

MSB-7288-PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 04.10.2002 08:58:27 AM

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	9	-
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	43	-
IX-3	Claims	1	-
IX-4	Abstract	1	EZABST00.TXT
IX-5	Drawings	1	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	55	
IX-6a	Sequence listing part of description filed in computer readable form only (under Section 801(a)(i))	-	1 Diskette
IX-7	TOTAL	55	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-16	Sequence listing in computer readable form:		
IX-16 (f)	additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	-	1 Diskette
IX-17	PCT-EASY diskette	-	Diskette
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	1	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative	<i>John W. Mahoney</i>	
X-1-1	Name (LAST, First)	MAHONEY, John, W.	
X-2	Signature of applicant, agent or common representative	<i>Robert W. Kuhn</i>	
X-2-1	Name	BAYER CORPORATION	
X-2-2	Name of signatory	Robert W. Kuhn	
X-2-3	Capacity	Vice President, Process Sciences	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/US

184
103

PCT REQUEST

MSB-7288-PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 04.10.2002 08:58:27 AM

10-5	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	
------	--	--

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	---	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MAHONEY, John, W.
Bayer Corporation
800 Dwight Way
P. O. Box 1986
Berkeley, CA 94701
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 14 January 2003 (14.01.03)	
Applicant's or agent's file reference MSB-7288-PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US02/31693	International filing date (day/month/year) 04 October 2002 (04.10.02)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 05 October 2001 (05.10.01)
Applicant BAYER CORPORATION et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
05 Octo 2001 (05.10.01)	60/327,730	US	28 Octo 2002 (28.10.02)
08 Sept 2002 (08.09.02)	80/408,288	US	28 Octo 2002 (28.10.02)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338-8989	Authorized officer S. Mandallaz Telephone No. (41-22) 338 8981
---	--

107
106

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF WITHDRAWAL
OF PRIORITY CLAIM

(PCT Rule 90bis.3 and
Administrative Instructions, Section 415(a) and (b))

To:

MAHONEY, John, W.
Bayer Corporation
800 Dwight Way
P. O. Box 1986
Berkeley, CA 94701
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 10 February 2003 (10.02.03)	
Applicant's or agent's file reference MSB-7288-PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US02/31693	International filing date (day/month/year) 04 October 2002 (04.10.02)
Applicant BAYER CORPORATION	

1. The applicant is hereby notified that the priority claim made in the international application has been withdrawn in accordance with a notice of withdrawal received from the applicant on:
23 January 2003 (23.01.03)

The attention of the applicant is drawn to the fact that the withdrawal of the priority claim will result in the re-calculation of time limits which have not already expired (see Rule 90bis.3(d)).

2. ☒ In the case where multiple priorities have been claimed, the above action relates to the following priority claim(s):

us 06 September 2002 (06.09.02) 60/408,288

3. A copy of this notification has been sent to the receiving Office and to:

- ☒ the International Searching Authority (where the international search report has not yet been issued)
☒ the designated Offices (which have already been notified of the receipt of the record copy)
☐ the International Preliminary Examining Authority

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Ghislaine BORNET Telephone No. (41-22) 338.55.25 <i>G. B. B. net</i>
--	--

Traducción

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT

INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(Artículo 36 y Regla 70 del PCT)

Referencia del expediente del agente o solicitante MSB-7288-PCT	PARA ACTUACIONES ADICIONALES	Ver notificación de Transmisión del Reporte de Examen Preliminar (Formato PCT/IPEA416)
Solicitud Internacional No. PCT/US02/31893	Fecha de presentación Internacional (día/mes/año) 4 de Octubre de 2002	Fecha de prioridad (día/mes/año) 5 de Octubre de 2001
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC IPC(7): C07K 16/00; A01N 37/18, C12P 21/06; C12N 15/00; C12Q 1/68 Y US CL: 530/324, 387.9; 514/2; 435/89.1,320.1,6		
Solicitante BAYER CORPORATION		

1. Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Administración encargada del Examen Preliminar Internacional y se envía al solicitante en concordancia con el artículo 36.

2. Este INFORME consta de una total de 4 hojas, incluyendo la portada

☐ Este informe también se acompaña de ANEXOS, esto es documentos de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido corregidos y que son la base de este informe y/o documentos que contienen rectificaciones realizadas ante esta Administración (Ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas según el PCT)

Estos anexos constan de un total de ____ hojas.

3. Este Informe contiene indicaciones relativas a los siguientes aspectos:

I ☒ Fundamentos del Informe

II ☐ Prioridad

III ☒ No se establece concepto relativo a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial

IV ☐ Carencia de unidad de la invención

V ☒ Declaración razonada según el artículo 35(2), en relación con la novedad, nivel inventivo o aplicación Industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración

VI ☐ Ciertos documentos citados

VII ☐ Ciertos defectos de la solicitud internacional

VIII ☐ Ciertas observaciones respecto a la solicitud internacional

Fecha de presentación de la demanda 1 de Mayo de 2003	Fecha de terminación de este reporte 2 de Enero de 2004
Nombre y dirección de correo de la autoridad encargada del examen preliminar Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-323	Funcionario Autorizado Robert A. Wax Teléfono No. (703) 308-1235

Formato PCT/IPEA/409 (portada) (julio 1998)

I. Base del Informe

1. Respecto a los elementos de la solicitud Internacional:*

- ☒ La solicitud Internacional como se presentó originalmente
- ☒ La descripción:
páginas 1-41, como se presentaron originalmente
páginas Ninguna, presentadas con la solicitud de examen
páginas Ninguna, presentadas junto con la carta del _____.
- ☒ Las reivindicaciones:
páginas 42 y 43, como se presentaron originalmente
páginas Ninguna, como se modificaron (junto con cualquier declaración bajo el artículo 19)
páginas Ninguna, presentadas con la solicitud de examen
páginas Ninguna, presentadas junto con la carta del _____.
- ☒ Los dibujos:
páginas 1/1, como se presentaron originalmente
páginas Ninguna, presentadas con la solicitud de examen
páginas Ninguna, presentadas junto con la carta del _____.
- ☐ La parte de listado de secuencias de la descripción:
páginas 1-13, como se presentaron originalmente
páginas Ninguna, presentadas con la solicitud de examen
páginas Ninguna, presentadas junto con la carta del _____.

2. Respecto al lenguaje, todos los elementos marcados anteriormente estuvieron disponibles o fueron enviados a la Administración en el lenguaje en que se presentó la solicitud Internacional, a menos que se indique otra cosa en este punto.

Estos elementos estuvieron disponibles o fueron enviados a esta Administración en el siguiente lenguaje _____ el cual es:

- ☐ el lenguaje de la traducción enviada para propósitos de la búsqueda Internacional (bajo Regla 23.1 (b)).
- ☐ el lenguaje de la publicación de la solicitud Internacional (bajo Regla 48.3(b)).
- ☐ el lenguaje de la traducción entregada con propósitos del examen preliminar Internacional (bajo Regla 55.2 y/o 55.3).

3. Respecto a cualquier secuencia de nucleótido y/o amino ácidos divulgada en la solicitud Internacional, el examen preliminar Internacional se llevó a cabo con base en el listado de secuencias:

- ☒ contenido en la solicitud Internacional en forma escrita
- ☒ presentado junto con la solicitud Internacional en forma legible por computador
- ☐ entregado posteriormente a esta Administración en forma legible por computador
- ☐ La declaración de que el listado de secuencias posteriormente entregado no va más allá de lo divulgado en la solicitud Internacional originalmente presentada, ha sido entregada.
- ☐ La declaración de que la información grabada en la forma legible por computador es idéntica al listado de secuencias escrito que se ha entregado.

4. ☒ Las modificaciones han dado como resultado la cancelación de:

- ☒ la descripción, páginas Ninguna,
- ☒ las reivindicaciones, Nos. Ninguna,
- ☒ los dibujos, página Ninguna,

5. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (parte de) las modificaciones no se hubieran realizado, ya que éstas han sido consideradas como una ampliación de lo inicialmente divulgado como se indica en la Casilla Suplementaria (Regla 70.2(c)).**

* Las hojas de reemplazo que han sido entregadas a la Oficina receptora en respuesta a la invitación bajo el Artículo 14 se refieren en este informe como "originalmente presentadas" y no se anexan a este informe ya que ellas no contienen modificaciones (Regla 70.16 y 70.17).

** Cualquier hoja de reemplazo que contenga dichas modificaciones deberá ser referida bajo el punto I y anexada a este informe.
Formato PCT/IPEA/409 (Recuadro I) (julio 1998)

III. No establecimiento de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.

1. La pregunta de si la invención reivindicada parece tener novedad, nivel inventivo (que no sea obvia), o que sea aplicable industrialmente no ha sido examinada con respecto a:

- ☐ la solicitud internacional completa
☒ las reivindicaciones Nos. 2-5, 7-11, 14 por que se refieren a una secuencia diferente a la SEQ ID NO: 6, la primera secuencia listada SEQ ID NO:

Porque

- ☐ la solicitud internacional, o las mencionadas reivindicaciones Nos. _____ se relacionan con los siguientes objetos, los cuales no requieren examen preliminar internacional (*especifique*): K
- ☐ la descripción, las reivindicaciones o los dibujos (*indique los elementos particulares abajo*) o las mencionadas reivindicaciones Nos. _____ son demasiado confusas que no se puede formar ninguna opinión significativa (*especifique*):
- ☐ la descripción, o las mencionadas reivindicaciones Nos. _____ no están adecuadamente soportadas por la descripción que no se puede formar ninguna opinión significativa.
- ☒ no se ha establecido un reporte de búsqueda para las mencionadas reivindicaciones Nos. 2-5, 7-11, 14
2. No se pudo realizar un examen preliminar internacional significativo debido a fallas en el listado de nucleótidos y/o aminoácidos para dar cumplimiento con los estándares del Anexo C de las Instrucciones Administrativas:
- ☐ El formato escrito no ha sido suministrado o no cumple con los estándares.
- ☐ El formato de lectura por computador no ha sido suministrado o no cumple con los estándares.

V. Declaración motivada según el Artículo 35(2) en cuanto a la novedad, el nivel inventivo y la aplicación industrial; citas y explicaciones que apoyan esta declaración.

1. DECLARACIÓN

Novedad (N)	Reivindicaciones	17	SI
	Reivindicaciones	1, 6, 12, 13, 15, 16	NO
Nivel inventivo (NI)	Reivindicaciones	Ninguna	SI
	Reivindicaciones	1, 6, 12, 13, 15-17	NO
Aplicación Industrial (AI)	Reivindicaciones	1, 6, 12, 13, 15-17	SI
	Reivindicaciones	Ninguna	NO

2. CITAS Y EXPLICACIONES (REGLA 70.7)

Las reivindicaciones 1, 6, 12, 13, 15 y 16 no son novedosas de acuerdo con el Artículo 33(2) del PCT debido a que son anticipadas por el documento WO 91/11457. WO 91/11457 enseña sobre un péptido GLP-1 (7-36), que es utilizado en el tratamiento de la diabetes Tipo II y es una variante funcionalmente equivalente de SEQ ID No: 6 (la presente reivindicación 1), una composición farmacéutica que comprende el polipéptido en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable (p. 28, líneas 20-23) (la presente reivindicación 6). WO 91/11457 enseña un método para el tratamiento de la diabetes Tipo II por medio de la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de esta proteína (Reivindicaciones 13 y 15) (presentes reivindicaciones 12-15).

Las reivindicaciones 1, 6, 12, 13 y 15-17 no alcanzan el nivel inventivo de acuerdo con el Artículo 33(3) del PCT ya que son obvias a partir de WO 91/11457 en vista de Hansen et al. (US 6,232,310). WO 91/11457 enseña un método para el tratamiento de la diabetes Tipo II al administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína mencionada arriba, un agonista del receptor de GLP-1 y un antagonista del glucagón (reivindicaciones 13 y 15)(presentes reivindicaciones 12-15). Hansen et al. Enseña un método para el tratamiento del estado pre-diabético de la disfunción de la tolerancia a la glucosa por la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido que es un agonista del receptor GLP-1 y un antagonista del glucagón (col 1, líneas 20-40).

Las reivindicaciones 1, 6, 12, 13 y 15-17 cumplen con los criterios especificados por el Artículo 33(4) del PCT, y así poseen aplicabilidad industrial debido a que el objeto reivindicado puede ser hecho o utilizado en la industria.

—NUEVAS CITAS—

Ninguna

**PÉPTIDOS QUE ACTÚAN COMO AGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLP-1 Y
COMO ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLUCAGÓN Y SUS MÉTODOS
DE USO FARMACOLÓGICO**

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a polipéptidos recientemente identificados que actúan al mismo tiempo como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón y al uso de dichos polipéptidos con fines terapéuticos. Más particularmente, los polipéptidos de la presente invención son útiles en la estimulación de la liberación de la insulina de las células beta pancreáticas en respuesta a la glucosa y en la reducción de la secreción glucagón-mediada de la glucosa del hígado, brindando de este modo una opción de tratamiento para aquellos individuos afectados de un trastorno metabólico tal como la diabetes, la hiperglucemia, la intolerancia a la glucosa en ayunas, la intolerancia a la glucosa, los estados prediabéticos y la obesidad.

ANTECEDENTES DEL ARTE RELACIONADO

La diabetes se caracteriza por una secreción deficiente de insulina que se manifiesta, entre otras cosas, por un nivel elevado de glucosa en sangre en el paciente diabético. Los defectos subyacentes conducen a una clasificación de la diabetes en dos grupos principales: la diabetes tipo 1 (o diabetes mellitus insulino dependiente, DMID), que surge cuando los pacientes carecen de células beta productoras de insulina en sus glándulas pancreáticas y la diabetes tipo 2 (o diabetes mellitus no insulino dependiente, DMNID), que ocurre en pacientes con secreción deficiente de insulina de las células beta y/o alteraciones en la acción de la insulina.

Los pacientes con diabetes tipo 1 se tratan actualmente con insulina, mientras que la mayoría de los pacientes con diabetes tipo 2 pueden tratarse con agentes que estimulan la función de las células beta o con agentes que

intensifican la sensibilidad de los tejidos de los pacientes hacia la insulina. Con el correr del tiempo, casi la mitad de los sujetos diabéticos tipo 2 pierden su capacidad de respuesta a estos agentes y entonces deben someterse a terapia insulínica. Las drogas utilizadas actualmente para tratar la diabetes tipo 2 incluyen los inhibidores de alfa-glucosidasa (PRECOSE®, VOGLIBOSE™ y MIGLITOL®), insulino-sensibilizantes (por ej., Avandia™, Actos™ y Rezulin™), secretagogos de insulina (sulfonilureas "SFUs") y otros agentes que actúan a través del canal de K⁺ ATP-dependiente), y GLUCOPHAGE™ (metformina clorhidrato).

Inhibidores de alfa-glucosidasa. Los inhibidores de la alfa-glucosidasa reducen la excursión de la glucosa postprandial al demorar la absorción de la glucosa del intestino. Estas drogas son seguras y proporcionan tratamiento para sujetos diabéticos afectados entre leve y moderadamente. Sin embargo, se ha informado acerca de efectos colaterales gastrointestinales en la literatura que limitan su efectividad.

Insulino-sensibilizantes. Los insulino-sensibilizantes son drogas que intensifican la respuesta del organismo a la insulina. Las tiozolidindionas tales como Avandia™ (rosiglitazona) y Actos™, activan al receptor gamma activado por proliferadores del peroxisoma (PPAR) y modulan la actividad de un conjunto de genes que no han sido bien descritos. Los efectos hepáticos (por ej., la hepatotoxicidad inducida por drogas y los niveles elevados de enzimas hepáticas) no parecen ser un problema significativo en pacientes que utilizan Avandia™ y Actos™. Aún así, se recomienda el análisis de las enzimas hepáticas cada dos meses en el primer año de terapia y en forma periódica con posterioridad. Los tratamientos con Avandia™ y Actos™ se asocian a retención de líquidos, edema y aumento de peso. Avandia™ no está indicada para usar con la insulina debido a la preocupación por la insuficiencia cardíaca congestiva. Rezulin™ (troglitazona),

la primera droga de esta clase, se abandonó debido a los elevados niveles de las enzimas hepáticas y a la hepatotoxicidad inducida por drogas.

Secretagogos de insulina. Las sulfonilureas (SFUs) y las no-sulfonilureas, Nateglinida y Pepaglinida, actúan a través del canal de potasio ATP-dependiente provocando la secreción de insulina glucosa-dependiente. Estas drogas son una terapia estándar para los diabéticos de tipo 2 que sufren hiperglucemia entre leve y moderada. Los secretagogos de insulina tienen limitaciones que incluyen la inducción potencial de hipoglucemia, el aumento de peso y las tasas elevadas de fracaso primario y secundario. Entre un diez y un 20% de los pacientes tratados inicialmente no logran demostrar un efecto significativo en el tratamiento (fracaso primario). El fracaso secundario se demuestra por una pérdida adicional del 20-30% del efecto en el tratamiento luego de seis meses de tratamiento con secretagogos de insulina. Se requiere tratamiento con insulina en el 50% de los pacientes que responden a los secretagogos de insulina después de 5-7 años de terapia (Scheen *et al.*, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 6:533-543, 1989). La Nateglinida y la Pepaglinida son drogas de corta acción que deben tomarse tres veces por día. Se utilizan sólo para el control de la glucosa post-prandial y no para el control de la glucosa en ayunas.

GLUCOPHAGE™ es una biguanida que reduce la glucosa sanguínea disminuyendo la producción de glucosa hepática e incrementando la captación y utilización de la glucosa periférica. La droga es efectiva para la reducción de la glucosa sanguínea en sujetos afectados entre leve y moderadamente y no posee un efecto colateral de aumento de peso o inducción potencial de hipoglucemia. Sin embargo, el **GLUCOPHAGE™** tiene una cantidad de efectos colaterales, incluyendo trastornos gastrointestinales y acidosis láctica. El **GLUCOPHAGE™** está contraindicado en diabéticos por encima de los 70 años de edad y en sujetos con deterioro de la función renal o hepática. Finalmente, el **GLUCOPHAGE™**

posee las mismas tasas de fracaso primario y secundario que los secretagogos de insulina.

El tratamiento con insulina se establece después que la dieta, el ejercicio y las medicaciones orales han fracasado en el control adecuado de la glucemia. Este tratamiento tiene varios inconvenientes: es inyectable, puede causar hipoglucemia y puede causar aumento de peso. La posibilidad de inducir hipoglucemia con la insulina limita la medida en que se puede controlar la hipoglucemia.

Los problemas con los actuales tratamientos requieren de nuevas terapias para tratar la diabetes de tipo 2. En particular, se necesitan nuevos tratamientos para mantener la secreción de insulina normal (es decir, glucosa-dependiente). Dado el papel de los péptidos similares al glucagón ("GLP-1") en la promoción de la secreción insulínica regulada por glucosa en el páncreas, los agonistas del receptor de GLP-1 son potencialmente valiosos en el tratamiento de dichas enfermedades. Es más, los antagonistas del receptor del glucagón deberían demostrar ser valiosos en el tratamiento de la diabetes de tipo 2, dado el papel del glucagón en la elevación de la glucosa plasmática por estimulación de la glucogenolisis y la gluconeogenesis.

Los GLP-1 y el glucagón son miembros de una familia de hormonas peptídicas relacionadas desde el punto de vista estructural: la familia glucagón/secretina. Dentro de esta familia, el GLP-1(7-36) y el GLP-1(7-37) (30 aminoácidos y 31 aminoácidos, respectivamente) y el glucagón (30 aminoácidos) constituyen un conjunto de péptidos altamente homólogos. Además, estas dos hormonas se originan a partir de un precursor común, el preglucagón, el cual, al procesarse en tejidos específicos, conduce a la producción de GLP-1 en forma predominante en el intestino y de glucagón en el páncreas. Los receptores de

estos dos péptidos son homólogos (58% de identidad) y pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la proteína-G.

El GLP-1 y el glucagón desempeñan, ambos, papeles principales en la homeostasis global de la glucosa. El GLP-1 reduce las concentraciones de glucosa plasmática mediado por la secreción de insulina glucosa-dependiente, mientras que el glucagón aumenta las concentraciones de glucosa plasmática. Dados los importantes papeles del GLP-1 y el glucagón en el mantenimiento de las concentraciones normales de glucosa sanguínea, ha habido un interés considerable por la identificación de los agonistas del receptor del GLP-1 y de los antagonistas del receptor del glucagón. Estudios clínicos han demostrado la capacidad de la infusión de GLP-1 para promover la secreción de insulina y normalizar la glucosa plasmática en sujetos diabéticos. Sin embargo, el GLP-1 se degrada rápidamente y tiene una vida media muy corta en el organismo. Asimismo, el GLP-1 produce efectos colaterales de motilidad intestinal en o en las cercanías de sus dosis terapéuticas. Por ende, el propio GLP-1 tiene limitaciones significativas como agente terapéutico y se están buscando versiones modificadas del péptido con estabilidad mejorada. No se han descrito hasta la fecha agonistas no peptídicos del receptor del GLP-1.

Se han identificado análogos peptídicos del glucagón que actúan como antagonistas del glucagón y reducen la hiperglucemia en ratas diabéticas. Sin embargo, ningún antagonista peptídico del glucagón ha avanzado más allá del desarrollo preclínico. Una cantidad de antagonistas no peptídicos del receptor del glucagón de estructuras diversas se han informado en la literatura científica y de patentes. Sin embargo, los intentos por identificar inhibidores del receptor del glucagón molecularmente pequeños han encontrado limitado éxito *in vivo*. El único antagonista de la acción del glucagón que se sabe activo en un estudio

clínico es un compuesto identificado como BAY 27-9955. Un efecto colateral potencial del antagonismo frente al glucagón es la hipoglucemia.

Debido a los efectos colaterales potenciales asociados con la administración tanto de un agonista del receptor de GLP-1 como de un antagonista del receptor del glucagón solos, una terapia combinada tendría la ventaja de mantener la disminución buscada de la glucemia reduciendo los efectos colaterales. La co-administración, sin embargo, requiere una formulación única y un enfoque de administración que brinde perfiles farmacocinéticos apropiados para ambos péptidos. Este podría ser un obstáculo fundamental para el desarrollo de semejante terapia.

Sobre la base de lo anterior, existe un considerable potencial para un péptido de terapia única que funcione tanto como agonista del GLP-1 como antagonista del glucagón *in vivo*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Esta invención provee polipéptidos novedosos que funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón y que son efectivos en el tratamiento de enfermedades y condiciones que pueden aliviarse por agentes que tengan actividad de agonistas del receptor del GLP-1 y de antagonistas del receptor del glucagón. Los polipéptidos de la presente invención proveen una nueva terapia para pacientes con, por ejemplo, trastornos metabólicos tales como los resultantes de la secreción disminuida de insulina endógena, en particular los diabéticos de tipo 2, o para pacientes con intolerancia a la glucosa, un estado prediabético que tiene una leve alteración de la secreción de insulina, o la intolerancia a la glucosa en ayunas, u obesidad.

Un aspecto de la invención es un polipéptido seleccionado del grupo integrado por las SEC ID NOS:6-32, como así también fragmentos, derivados y variantes de polipéptidos que funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y

como antagonistas del receptor del glucagón a un nivel sustancialmente igual al de los polipéptidos que se muestran en las SEC ID NOS:6-32 (colectivamente, "polipéptidos de la invención").

Otras realizaciones de la invención incluyen a polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención y los vectores y células huésped concurrentes necesarios para expresar en forma recombinante los polipéptidos.

Otras realizaciones más de la invención proporcionan métodos para el tratamiento de la diabetes y/u otras enfermedades o condiciones afectadas por polipéptidos de la invención en mamíferos, incluyendo a los humanos. Los métodos implican la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de los polipéptidos de la presente invención a un mamífero.

La invención también proporciona métodos recombinantes y de síntesis para preparar polipéptidos de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

La Figura 1 es un mapa de restricción de un plásmido típico que contiene una secuencia codificadora de un polinucleótido de fusión de un péptido GST.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La invención proporciona polipéptidos novedosos, como así también fragmentos, derivados y variantes de los mismos que funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón. Los polipéptidos de la invención funcionan in vivo como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón en la prevención y/o tratamiento de enfermedades o condiciones tales como la diabetes, la hiperglucemia, la intolerancia a la glucosa, la intolerancia a la glucosa en ayunas y la obesidad.

El GLP-1 y el glucagón son miembros de una familia de hormonas peptídicas relacionadas desde el punto de vista de la estructura: la familia

glucagón/secretina. La alineación acumulada siguiente muestra as relaciones estructurales primarias.

Glucagón	HSQGTFTSDYSKYLEGQAAKEFIAWLVKGR (SEC ID NO:1)
GLP-1 (7-36)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO:2)
GLP-1 (7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO:3)

Las abreviaturas de una sola letra de los aminoácidos se pueden encontrar en Zubay, Biochemistry 2da. Edición, 1988, MacMillan Publishing, New York, pág. 33. estos polipéptidos desempeñan un papel en la homeostasis global de la glucosa: el GLP-1 reduce las concentraciones plasmáticas de glucosa mientras que el glucagón incrementa las concentraciones plasmáticas de glucosa.

Dado el papel de los GLP-1s en la promoción de la secreción insulínica regulada por glucosa en el páncreas, los agonistas del receptor de GLP-1 son potencialmente valiosos en el tratamiento de trastornos metabólicos y otras enfermedades. Es más, los antagonistas del receptor del glucagón deberían demostrar también ser valiosos en el tratamiento de las enfermedades, dado el papel del glucagón en la elevación de la glucosa plasmática por estimulación de la glucogenolisis y la gluconeogenesis. Sin embargo, estos hechos por sí solos no garantizan la reducción de la glucosa *in vivo* sin inducir significativos efectos colaterales.

La invención proporciona polipéptidos nuevos que son agonistas del receptor de GLP-1 y antagonistas del receptor del glucagón. Sin ceñirnos a la teoría, creemos que los polipéptidos de la invención son capaces de reducir los niveles de glucosa *in vivo* por estimulación de la liberación de insulina de las células beta pancreáticas de manera glucosa-dependiente, reduciendo al mismo tiempo la secreción de glucosa del hígado mediada por glucagón.

Polipéptidos agonistas del receptor del GLP-1 y antagonistas del receptor del glucagón

Los polipéptidos de la invención funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón. El componente agonista del receptor del GLP-1 de dichos polipéptidos activa al receptor del GLP-1 en uno o más ensayos *in vitro* o *in vivo* de activación del receptor del GLP-1. Ejemplos de dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, ensayos *in vitro* de inducción del cAMP en células RINm5F, ensayos *in vitro* de inducción de la secreción de insulina de las células β pancreáticas, ensayos *in vivo* de reducción de los niveles plasmáticos de glucosa y ensayos *in vivo* de elevación de los niveles plasmáticos de insulina, según se describe en los ejemplos específicos más adelante.

Los polipéptidos de la invención también demuestran actividad antagonista del receptor del glucagón en uno o más ensayos *in vitro* o *in vivo* de inhibición de la activación del receptor del glucagón. Ejemplos de dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, ensayos *in vitro* de inhibición del aumento del cAMP celular mediado por glucagón, ensayos *in vitro* para medir la inhibición de la liberación de glucosa mediada por glucagón de, por ejemplo, hepatocitos cultivados, o ensayos *in vivo* de producción de glucosa estimulada por glucagón, según se describe en los ejemplos específicos más adelante.

Los polipéptidos preferidos de la invención se seleccionan del grupo integrado por: (1) SEC ID NOS:6:32 y (2) sus fragmentos, derivados, variantes y análogos que funcionen como antagonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón sustancialmente al mismo nivel que cualquiera de los polipéptidos que se muestran en SEC ID NOS:6-32.

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser polipéptidos naturales, polipéptidos recombinantes o polipéptidos sintéticos.

Los polipéptidos fragmentarios, derivados, variantes y análogos retienen sustancialmente la misma función o actividad biológica que, por ejemplo, los polipéptidos que se muestran en la SEC ID NOS:6-32. "Sustancialmente la misma

función o actividad biológica" es aproximadamente del 30% al 100% (es decir, el 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100%) o más de la misma actividad biológica del polipéptido de extensión completa con el cual se compara.

Derivados

Los derivados incluyen a polipéptidos de la invención que han sido modificados químicamente para otorgarles una estructura y/o función adicional. Por ejemplo, puede agregarse polietilenglicol (PGE) o un ácido graso a un polipéptido para mejorar su vida media. Se pueden construir también polipéptidos de fusión que confieran una especificidad de blanco o una actividad adicional, según se describe con mayor detalle más adelante.

Los derivados se pueden modificar ya sea por medio de un proceso natural, tal como el procesamiento posttraduccional, como por medio de técnicas de modificación química, siendo ambos bien conocidos en el arte. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier parte del polipéptido, incluida la cadena peptídica, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos amino o carboxilo terminales. Se podrá apreciar que puede estar presente el mismo tipo de modificación en la misma o diversa medida en varios sitios de un dado polipéptido. También, una variante puede contener uno o más tipos diferentes de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser, por ejemplo, ramificados, por ejemplo, como consecuencia de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación.

Otras modificaciones químicas incluyen la acetilación, acilación, ribosilación con ADP, amidación, unión covalente de la flaviná, unión covalente de un grupo hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente del fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de

piroglutamato, formulación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de un ancla de GPI, hidroxilación, iodación, metilación, miristoilación, oxidación, incorporación de un resto de PEG, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas, tal como la arginilación, mediada por ARN de transferencia y ubiquitinación. (Ver, por ejemplo, T.E. Creighton, **PROTEINS, STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES**, 2da. Edición, W.H. Freeman and Company, New York (1993); **POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS**, B.C. Jonson, ed., Academic Press, New York, páginas 1-12 (1983); Seifter *et al.*, *Meth. Enzymol* 182:626-46 (1990); Ratan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663:48-62, 1992).

Los derivados incluyen también a polipéptidos que se han fusionado con otro polipéptido, como por ejemplo la albúmina sérica humana, para mejorar su perfil farmacocinético. La fusión de dos polipéptidos se puede lograr por cualquier medio conocido por un experto en el arte. Por ejemplo, pueden clonarse un ADN que codifica la albúmina sérica humana y una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de la invención en cualquier vector de expresión de mamífero conocido por un experto en el arte. Se prefiere la localización de un polipéptido de la invención en posición N-terminal respecto del otro polipéptido pues parece que se requiere una histidina N-terminal para la actividad del receptor del GLP-1 (Kawa, *Endocrinology* Aproximadamente, 124(49):1768-73, 1989). La proteína de fusión recombinante resultante puede entonces expresarse transformando una línea celular adecuada, tal como HKB o CHO, con el vector y expresando la proteína de fusión.

Los derivados preferidos incluyen a polipéptidos de la invención (SEC ID NOS:6-32) a los cuales se ha unido un resto de PEG o un resto de ácido graso. El resto de PEG puede ser, por ejemplo, un PEG de peso molecular mayor de 22

kDa, con preferencia un peso molecular de entre 25 kDa y 100 kDa (por ej., 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 kDa), y con mayor preferencia un peso molecular de entre 35 kDa y 45 kDa (por ej., 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 ó 45 kDa). Ejemplos de dichos polipéptidos unidos a PEG son aquellos que contienen un resto de PEG de 22 kDa unido al residuo de cisteína de la posición 31 de las SEC ID NOS:19 ó 25. Ver las SEC ID NOS:20 y 26 y la Tabla 2. como alternativa, puede estar unido un resto de PEG de 43 kDa al residuo de cisteína de la posición 31 de la SEC ID NO:25. Ver la SEC ID NO:27 y la tabla 2. Puede agregarse un resto de PEG a un residuo de cisteína de polipéptidos de la invención por métodos bien conocidos en el arte; ver, por ejemplo, el Ejemplo 19.

Otros derivados preferidos tienen un resto de ácido graso unido al polipéptido. El resto de ácido graso puede ser, por ejemplo, un ácido graso de entre C₁₂ y C₂₀, con preferencia un ácido graso de entre C₁₄ y C₁₈ y, por sobre todo, con mayor preferencia, de C₁₆. ejemplos de dichos polipéptidos son las SEC ID NOS:28-32, que contienen un resto de ácido graso de C₁₆ (palmitato) unido a un residuo de lisina dentro del péptido. Ver la Tabla 2. puede agregarse un resto de ácido graso a un residuo de lisina de polipéptidos de la invención por métodos bien conocidos en el arte como, por ejemplo, la acilación de ácidos grasos (Knudsen *et al.*, *J. Med. Chem.* 43:1664-1669, 2000).

Variantes

Las variantes son polipéptidos de la invención que poseen uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos con respecto a las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEC ID NOS:6-32.. las variantes también pueden tener aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos modificados, es decir isómeros de péptidos, y pueden contener aminoácidos diferentes de los 20 aminoácidos naturales.

Con preferencia, las variantes contienen una o más sustituciones de aminoácidos conservativas (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 sustituciones), con preferencia en residuos de aminoácidos no esenciales. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede alterarse a partir de una secuencia de proteína de tipo salvaje sin alterar su actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" se requiere para la actividad biológica. Una sustitución de aminoácido conservativa es aquella en la cual el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en el arte las familias de residuos de aminoácidos que poseen cadenas laterales similares. estas familias incluyen a aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ej. lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ej. ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ej. glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ej. alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ej. treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ej. tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Las sustituciones no conservativas no se harían para residuos de aminoácidos conservados o para residuos de aminoácidos con localización en un dominio de proteína conservado.

Las sustituciones conservativas de aminoácidos se realizan con preferencia en las posiciones 11, 12, 16, 17 ó 18 del polipéptido de consenso que se muestra en la SEC ID NO:34. La posición 11 es con preferencia R, S, A, K, G o T, y con mayor preferencia R, A, G o S. La posición 12 es con preferencia K, N, R, H, A, S o Q, y con mayor preferencia K, A, S o N. La posición 16 es con preferencia K, R, V, I, L, M, F, W, Y, A, S, T, N, Q, G o H, y con mayor preferencia K, V, I, F, A, S o N. La posición 17 es con preferencia D, E, H, K, R, F, I, L, M, Y, V, W, A, S, T, N, Q o G, y con mayor preferencia R, A, L, M, V, S, H, E o Q. La posición 18 es con

preferencia K, R, F, I, L, Y, V, M, A, G o H, y con mayor preferencia K, R, F, I, L, Y o A. Todas las posibles combinaciones de sustituciones en las posiciones 11, 12, 16, 17 y 18, incluyendo la no sustitución en cualquiera, en dos, en tres o en cuatro de estas posiciones, quedan previstas en forma específica.

Las variantes también incluyen a polipéptidos que difieren en su secuencia de aminoácidos debido a mutagénesis. Las variantes que funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón pueden identificarse detectando bibliotecas combinatorias de mutantes; por ejemplo, los mutantes de polipéptidos con sustituciones conservativas en 1 o más posiciones (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 posiciones) pueden ensayarse para detectar la actividad agonista del receptor del GLP-1 y la actividad antagonista del receptor del glucagón utilizando métodos bien conocidos en el arte y que se describen en los ejemplos específicos más adelante.

Análogos

Un análogo incluye a un propolipéptido, en donde el propolipéptido incluye a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención. Los polipéptidos activos de la invención pueden sufrir ruptura de los aminoácidos adicionales de la molécula del propolipéptido por procesos naturales in vivo o por procedimientos bien conocidos en el arte, tales como ruptura enzimática o química.

Fragmentos

Un fragmento es un polipéptido menor que uno de extensión total de la invención, que incluye un derivado, variante o análogo de extensión total, que posee actividad agonista del receptor del GLP-1 y antagonista del receptor del glucagón.

Cualquier secuencia de polinucleótido que codifique un polipéptido de la invención se puede utilizar para expresar el polipéptido. Los polinucleótidos

pueden consistir sólo en una secuencia codificadora para un polipéptido o pueden incluir secuencias codificadoras y/o no-codificadoras adicionales.

Las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido de la invención se pueden sintetizar en todo o en parte utilizando métodos químicos bien conocidos en el arte (ver, por ejemplo, Caruthers *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215-23, 1980; Horn *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-32, 1980). El polinucleótido que codifica el polipéptido puede luego clonarse en un vector de expresión para expresar el polipéptido o en un vector de clonación, para propagar el polinucleótido.

Como comprenderán aquellos con experiencia en el arte, puede resultar ventajoso producir las secuencias codificadoras de polipéptidos que posean codones no naturales. Por ejemplo, se pueden seleccionar codones preferidos por un huésped procariota o eucariota para aumentar la velocidad de expresión de un polipéptido o para producir un transcripto de ARN que posea propiedades deseables, tales como la vida media, que sea mayor que la de un transcripto generado a partir de la secuencia natural.

Las secuencias nucleotídicas descritas aquí pueden prepararse mediante ingeniería genética utilizando métodos generalmente conocidos en el arte para alterar las secuencias codificadoras de polipéptidos por una variedad de razones, que incluyen, sin ser limitativos, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento y/o expresión del polipéptido o del mRNA producto. La transposición del ADN mediante fragmentación aleatoria y el reensamblado de fragmentos de genes y de oligonucleótidos por PCR pueden usarse para preparar secuencias nucleotídicas mediante ingeniería genética. Por ejemplo, puede utilizarse la mutagénesis de sitio dirigido para insertar nuevos sitios de restricción, alterar patrones de glicosilación, cambiar la preferencia por codones, producir variantes de corte, introducir mutaciones, etc.

Vectores

La presente invención también incluye a vectores de clonación y de expresión que comprenden una o más secuencias nucleotídicas que codifican un polipéptido de la invención. La secuencia nucleotídica puede insertarse con orientación hacia delante o hacia atrás. Una secuencia de ADN puede insertarse en un vector por una variedad de procedimientos. En general, una secuencia de ADN se inserta en un sitio de endonucleasa de restricción apropiado por procedimientos conocidos en el arte y descritos en Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2da. Edición (Cold Spring Harbor, N. Y., 1989). Se considera a estos procedimientos y a otros incluidos en el alcance de los expertos en el arte.

Ejemplos de vectores de clonación incluyen, sin ser limitativos, a pBR322, pUC18, pUC19, pSport y pCRII.

En un aspecto preferido de esta realización, un vector de expresión comprende además secuencias regulatorias, que incluyen, por ejemplo, a un promotor, ligadas operativamente a la secuencia codificadora. Los expertos en el arte conocen un gran número de vectores y promotores de expresión apropiados y se pueden adquirir en el comercio. Los vectores de expresión siguientes se presentan a modo de ejemplo. Los vectores de expresión bacterianos incluyen, sin ser limitativos, a pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTRC99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, PRIT5 (Pharmacia). Los vectores de expresión eucariotas incluyen, sin ser limitativos, a pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, PSVL (Pharmacia). Sin embargo, puede utilizarse cualquier otro vector de clonación o expresión en la medida que sea replicable y viable en el huésped deseado. Las regiones de promotor se pueden seleccionar de cualquier gen deseado utilizando vectores de expresión

CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son el pKK232-8 y el pCM7. Promotores bacterianos con nombres particulares incluyen a *lacI*, *lacZ*, T3, T7, *gpt*, λ P_R , P_L y *trp*. Los promotores eucariotas incluyen al CMV temprano inmediato, HSV timidina quinasa, SV40 temprano y tardío, LTRs de retrovirus y metalotioneína-I de ratón. La selección de un vector y un promotor adecuados está dentro del nivel común de la capacidad de un experto del arte.

Un vector de expresión también puede contener un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción, un terminador de transcripción y secuencias adecuadas para amplificar la expresión. Los vectores de expresión pueden contener un gen que confiera un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas, tal como la dihidrofolato reductasa o la resistencia a la neomicina para un cultivo de células eucariotas, o tal como la resistencia a las tetraciclinas o la ampicilina para un cultivo de *E. coli*.

Bibliotecas

En una realización, se genera una biblioteca de variantes por mutagénesis combinatoria a nivel de los ácidos nucleicos y es codificada por una biblioteca genética variegata. Puede producirse una biblioteca de variantes, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias genéticas tales que un conjunto degenerado de secuencias de aminoácidos variantes potenciales sea expresable como polipéptidos individuales, o, alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para despliegue de fagos) que contengan el conjunto de secuencias en las mismas.

Existe una variedad de métodos que se pueden utilizar para producir bibliotecas de variantes potenciales a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia genética degenerada puede

realizarse en un sintetizador automático de ADN, y luego ligarse a un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite la provisión, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias análogas potenciales. Se conocen en el arte métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados (ver, por ejemplo, Narang, *Tetrahedron* 39:3 (1983); Itakura *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* 53:323 (1984); Itakura *et al.*, *Science* 198:1056 (1984); Ike *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 11: 477, 1983).

Se conocen en el arte diversas técnicas para detectar productos génicos de bibliotecas combinatorias preparados mediante mutaciones puntuales o truncamiento y para detectar bibliotecas de cADN para productos génicos que tengan una propiedad seleccionada. Dichas técnicas son adaptables para la detección rápida de las bibliotecas génicas generadas por la mutagénesis combinatoria de los polipéptidos de la invención. Las técnicas más utilizadas, que se pueden adaptar al análisis de alto rendimiento para detectar grandes bibliotecas génicas, incluyen típicamente la clonación de la biblioteca génica a vectores de expresión replicables, la transformación de células apropiadas con la biblioteca resultante de vectores y la expresión de los genes combinatorios en condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilite el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis de ensamblado recursivo (REM), una técnica que intensifica la frecuencia de los mutantes funcionales de las bibliotecas, puede utilizarse en combinación con los ensayos de detección para identificar las variantes deseadas.

Células huésped

La presente invención también proporciona células huésped que contienen los vectores descritos anteriormente. La célula huésped puede ser una célula

eucariota superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariota inferior, tal como una célula de levadura. En forma alternativa, la célula huésped puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana.

Las células huésped se pueden procesar mediante ingeniería genética (transducidas, transformadas o transfectadas) con los vectores de clonación o expresión de la invención. El vector puede encontrarse, por ejemplo, en forma de plásmido, de partícula viral o de fago. Las células huésped tratadas mediante ingeniería genética pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según sea adecuado para la activación de los promotores o la selección de los transformantes. La selección de las condiciones apropiadas de cultivo, tales como la temperatura y el pH, está dentro del nivel común de la capacidad de un experto del arte.

Como ejemplos representativos de huéspedes apropiados se incluyen, sin ser limitativos, células bacterianas tales como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces*; células fúngicas, tales como levaduras; células de insectos tales como la *Drosophila S2* y la *Spodoptera Sf9*; células de mamífero tales como las CHO, COS o de melanoma de Bowes. La selección de un huésped apropiado se considera dentro del alcance de los expertos del arte a partir de las enseñanzas contenidas en la presente.

La introducción el constructo en la célula huésped puede efectuarse, por ejemplo, mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por Dextrano DEAE o por electroporación (Davis et al., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986). Los constructos de las células huésped pueden usarse de modo convencional para producir el producto genético codificado por la secuencia recombinante.

Expresión de Proteínas

Pueden expresarse proteínas maduras en células de mamífero, de levaduras, de bacterias o en otras células bajo el control de promotores apropiados. Pueden emplearse también sistemas de traducción libres de células para producir dichas proteínas utilizando ARNs derivados de constructos de ADN e la presente invención. Se describen vectores de clonación y expresión adecuados para utilizar con huéspedes procariotas y eucariotas, según se mencionó anteriormente y en Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2da. Edición (Cold Spring harbor, N. Y., 1989).

La transcripción de un ADN que codifica polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores puede incrementarse insertando una secuencia amplificadora en el vector de expresión. Los amplificadores son elementos de ADN que actúan en forma *cis*, habitualmente de entre aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Los ejemplos incluyen al amplificador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pares de bases 100 a 270), a un amplificador del promotor temprano del citomegalovirus, a un amplificador de polioma del lado tardío del origen de replicación y a los amplificadores de adenovirus. Por lo general, los vectores de expresión recombinante incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permitan la transformación de la célula huésped, por ej. el gen de la resistencia a la ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural corriente abajo. Dichos promotores pueden derivar de operones que codifiquen enzimas glicolíticas tales como la 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), el factor α , la fosfatasa ácida o las proteínas de choque térmico, entre otras. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en fase apropiada con las secuencias de traducción, iniciación y terminación y, con

preferencia, con una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida al espacio periplásmico o al medio extracelular. En forma opcional, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluya un péptido de identificación de aminoácidos N-terminales que imparta características deseadas, como por ej., la estabilización o la purificación simplificada del producto recombinante expresado.

Después de la transformación de una cepa adecuada del huésped y del crecimiento de la cepa del huésped hasta una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se desreprime por medios apropiados (por ej. cambio de temperatura o inducción química) y las células se cultivan por un período adicional. Las células se cosechan típicamente por centrifugación y se desgarran por medios físicos o químicos. El extracto bruto resultante se conserva para su posterior purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden desgarrarse por cualquier método conveniente, incluyendo los ciclos congelación-descongelación, la sonicación, la disrupción mecánica o el uso de agentes de lisado celular.

Pueden utilizarse también diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar proteínas recombinantes. Ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen a las líneas COS-7 de los fibroblastos de riñón de mono, descritas por Gluzman, *Cell* 23:175 (1981) y a otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, como, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y HBK.

Purificación de proteínas

Los polipéptidos de la presente invención se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos celulares recombinantes por métodos bien conocidos en el arte, incluyendo la precipitación con sulfato de amonio o etanol, la extracción con ácidos, la cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, la cromatografía

sobre fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrofóbica, la cromatografía de afinidad, la cromatografía sobre hidroxapatita y la cromatografía de lectinas. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) puede emplearse como paso final de purificación.

Los polipéptidos de la invención pueden aislarse convenientemente según se describe en los ejemplos específicos más adelante. Un polipéptido purificado tiene por lo menos aproximadamente un 70% de pureza, o sea que el polipéptido aislado está sustancialmente libre de material celular y tiene menos de aproximadamente el 30% (en peso seco) de material no-polipeptídico. Con preferencia, los preparados tienen una pureza de entre el 85% y el 99% (es decir, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 96, 97, 98 y 99%). La pureza de los preparados puede determinarse por cualquier medio conocido en el arte, tal como la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, espectrometría de masa y cromatografía líquida.

Modificación post-traducciona

Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la invención se pueden glicosilar con hidratos de carbono de mamíferos u otros eucariotas o pueden ser no-glicosilados. Los polipéptidos de la invención también pueden incluir un residuo inicial del aminoácido metionina.

Síntesis química

Como alternativa, los polipéptidos de la invención pueden producirse utilizando métodos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos, tal como por síntesis de péptidos directa usando técnicas de fase sólida (ver, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149 – 2154, 1963; Roberge *et al*, *Science* 269, 202 – 204, 1995). La síntesis de polipéptidos puede realizarse utilizando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede

lograrse, por ejemplo, usando el Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). En forma opcional, los fragmentos de un polipéptido se pueden sintetizar separadamente y combinarse usando métodos químicos para producir una molécula de extensión completa.

Un polipéptido recién sintetizado puede purificarse en forma sustancial por medio de cromatografía líquida de alta resolución (ver, por ejemplo, Creighton, *Proteins: Structures And Molecular Principles*, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). La composición de un polipéptido sintético de la presente invención se puede confirmar mediante análisis o secuenciación de aminoácidos, por ejemplo mediante el procedimiento de degradación de Edman (ver Creighton, más arriba). Además, cualquier porción de la secuencia de aminoácidos del polipéptido se puede alterar durante la síntesis directa y/o combinarse usando métodos químicos con secuencias provenientes de otras proteínas para producir una variante de polipéptido o un polipéptido de fusión.

Aplicaciones Farmacéuticas

Los polipéptidos de la presente invención pueden utilizarse para tratar la diabetes de tipo 2 (diabetes mellitus no-insulino dependiente) y/o evitar que los sujetos con intolerancia a la glucosa, intolerancia a la glucosa en ayunas, hipoglucemia y/u obesidad, desarrollen una diabetes de tipo 2.

Composiciones farmacéuticas

Los polipéptidos de la presente invención pueden combinarse con un vehículo aceptable para uso farmacéutico para formar una composición farmacéutica para administración parenteral. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido y un vehículo o excipiente aceptable para uso farmacéutico. Los vehículos aceptables para uso farmacéutico incluyen, pero sin ser limitativos, la solución salina, la solución salina bufferizada,

la dextrosa, el agua, el glicerol, el etanol y sus combinaciones. La formulación debe adaptarse a la modalidad de administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de manera conveniente, por ej., por vía oral, tópica, endovenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o intradérmica. Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad que resulte efectiva para el tratamiento y/o profilaxis de la indicación específica. Las dosis adecuadas oscilan entre aproximadamente por lo menos 3,5 ng de polipéptido activo (es decir, sin incluir el peso de un resto de PEG o ácido graso)/kg de peso corporal y aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal por día. En la mayoría de los casos, la dosis es de entre aproximadamente 0,1 µg/kg y aproximadamente 35 µg/kg (es decir, 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 µg/kg) de peso corporal por día, teniendo en cuenta las vías de administración, síntomas, etc. Estos números no tienen en cuenta la biodisponibilidad del péptido *in vivo*, en cuyo caso puede usarse mayor o menor cantidad para alcanzar la dosis efectiva deseada. La determinación de una dosis está dentro de la capacidad común del experto del arte y requiere sólo detección de rutina.

Los polipéptidos de la presente invención también pueden emplearse en combinación con otros agentes farmacéuticos útiles en el tratamiento de la diabetes, la intolerancia a la glucosa en ayunas, la intolerancia a la glucosa, la hiperglucemia y la obesidad. Los agentes apropiados incluyen a los secretagogos de insulina, los insulino-sensibilizantes y la metformina HCl.

La invención también provee envases o equipos farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Puede estar asociado al envase o equipo un aviso en forma prescrita por una agencia gubernamental que regule

la fabricación, uso o venta de fármacos o productos biológicos y que refleje la aprobación por parte de la agencia.

Terapia génica

Un polipéptido de la invención también puede expresarse *in vivo*, lo cual con frecuencia se denomina "terapia génica". Así, por ejemplo, pueden obtenerse células mediante ingeniería genética con un polinucleótido (ADN o ARN) que codifique el polipéptido *ex vivo* y luego administrarse esas células a un paciente para ser tratado con el polipéptido. Dichos métodos son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, se pueden obtener células mediante ingeniería genética por procedimientos conocidos en el arte usando una partícula retroviral que contenga un ARN que codifique los polipéptidos de la presente invención.

En una realización preferida, al ADN que codifica los polipéptidos de la invención se utiliza en terapia génica para trastornos tales como la diabetes. De acuerdo a esta realización, la terapia génica con el ADN que codifica los polipéptidos de la invención se provee a un paciente que la necesita en forma concurrente con o inmediatamente después del diagnóstico.

La administración local de polipéptidos que utiliza la terapia génica puede suministrar el agente terapéutico al área blanco, es decir el páncreas. Por ejemplo, se utilizó un promotor específico para crear un modelo de tumor pancreático en células beta de ratón (Hanahan, *Nature* 315 (6015): 115-22, 1985).

Se consideran tanto metodologías de terapia génica *in vitro* como *in vivo*. se conocen varios métodos para transferir genes potencialmente terapéuticos a poblaciones celulares definidas. Ver, por ej., Mulligan, *Science* 260: 926-31, 1993. estos métodos incluyen:

1) Transferencia directa de genes. Ver, por ej., Wolf et al., "Direct Gene transfer Into Mouse Muscle *In Vivo*", *Science* 247:1465-68, 1990;

2) Transferencia de ADN mediada por liposomas. Ver, por ej., Caplen et al., "Liposome-mediated CFTR Gene Transfer To The nasal Epithelium Of Patients With Cystic Fibrosis", *Nature Med.* 3:39-46, 1995; Cristal, "The Gene As A Drug", *Nature Med.* 1:15-17, 1995; Gao y Huang, "A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection Of Mammalian Cells", *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179:280-85, 1991;

3) Transferencia de ADN mediada por retrovirus. Ver, por ej., Kay et al., "In Vivo gene Therapy Of Hemophilia B: Sustained Partial Correction In Factor IX-Deficient Dogs", *Science* 262:117-19, 1993; Anderson, "Human Gene Therapy", *Science* 256:808-13, 1992.

4) Transferencia de ADN mediada por Virus del ADN. Dichos virus del ADN incluyen a los adenovirus (con preferencia los vectores basados en Ad-2 ó Ad-5), los virus del herpes (con preferencia vectores basados en el virus del herpes simplex) y parvovirus (con preferencia vectores basados en parvovirus "defectuosos" o no autónomos, con mayor preferencia vectores basados en virus adeno-asociados y, por sobre todo, con mayor preferencia, vectores basados en AAV-2). Ver, por ej., Ali et al., "The Use Of DNA Viruses As vectors For Gene Therapy", *Gene Therapy* 1:367-84, 1994; Patente de los Estados Unidos 4.797.368 y Patente de los Estados Unidos 5.139.941.

Sistemas de vectores para terapia génica

La elección de un sistema de vectores particular para transferir un gen de interés dependerá de una variedad de factores. Un factor importante es la naturaleza de la población celular blanco. Aunque los vectores retrovirales se han estudiado y usado extensamente en una cantidad de aplicaciones de terapia génica, estos vectores por lo general son inapropiados para infectar células que no están en división. Además, los retrovirus tienen una oncogenicidad potencial. Sin embargo, desarrollos recientes en el campo de los vectores lentivirales

pueden evitar algunas de estas limitaciones. Ver Naldini et al., *Science* 272:263-7, 1996.

El experto en el arte podrá apreciar que cualquier vector de terapia génica adecuado que codifique polipéptidos de la invención puede usarse de conformidad con esta realización. Son conocidas las técnicas para construir dichos vectores. Ver, por ej., Anderson, *Nature* 392 25-30, 1998; Verma y Somia, *Nature* 389 239-242, 1998. la introducción del vector al sitio blanco puede lograrse usando técnicas conocidas.

Los vectores de terapia génica adecuados incluyen a uno o más promotores. Los promotores adecuados que se pueden utilizar incluyen, sin ser limitativos, a los promotores virales (por ej. el LTR retroviral, el promotor SV40, el promotor tardío principal del adenovirus, el promotor del virus sincitial respiratorio, el promotor del parvovirus B19 y el promotor del citomegalovirus humano (CMV) descrito en Miller et al., *Biotechniques* 7(9): 980-990, 1989), los promotores celulares (por ej. los promotores de la histona, el polipéptido III y la β -actina) y los promotores inducibles (por ej. el promotor MMT, el promotor de la metalotioneína y el promotor del choque térmico). La selección de un promotor adecuado será evidente para aquellos con experiencia en el arte a través de las enseñanzas contenidas en la presente.

Retrovirus

Los retrovirus a partir de los cuales pueden derivar los vectores de los plásmidos retrovirales mencionados anteriormente incluyen, sin ser limitativos, al Virus de la Leucemia Murina Moloney, el virus de la necrosis del bazo, los retrovirus tales como el Virus del sarcoma Rous, el Virus del Sarcoma Harvey, el virus de la leucosis de las aves, el virus de la leucemia del mono gibón, el virus de inmunodeficiencia humana, el Virus del Sarcoma Mieloproliferativo y el virus del

tumor de mama. En una realización, el vector del plásmido retroviral se deriva del Virus de la Leucemia Murina Moloney.

El vector del plásmido retroviral se utiliza para transducir líneas celulares de empaquetamiento para formar líneas celulares productoras. Ejemplos de células de empaquetamiento que se pueden transfectar incluyen, sin ser limitativos, a las líneas celulares PE501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+E-86, GP+envAm12 y DAN, según se describe en Miller, *Human Gene Therapy*, 1: 5-14, 1990. El vector puede transducir las células de empaquetamiento a través de cualquier medio conocido en el arte. Dichos medios incluyen, sin ser limitativos, la electroporación, el uso de liposomas y la precipitación con CaPO_4 . En una alternativa, el vector del plásmido retroviral puede estar encapsulado en un liposoma o acoplado a un lípido y luego administrarse a un huésped. La línea celular productora genera partículas del vector retroviral que incluye a la(s) secuencia(s) de ácido nucleico que codifica(n) los polipéptidos de la invención. Luego dichas partículas de vector retroviral pueden usarse para transducir células eucariotas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Las células eucariotas transducidas expresarán la(s) secuencia(s) de ácido nucleico que codifica(n) los polipéptidos de la invención. Las células eucariotas que se pueden transducir incluyen, sin ser limitativos, las células germinales embrionarias, las células de carcinoma embrionario como así también las células germinales hematopoyéticas, los hepatocitos, los fibroblastos, mioblastos, queratinocitos, células endoteliales y células del epitelio bronquial.

Adenovirus y virus adeno-asociados

Los adenovirus tienen la ventaja de que tienen un amplio rango de huéspedes, pueden infectar células en reposo o diferenciadas en forma terminal, tal como las neuronas o hepatocitos y parecen ser esencialmente no-oncogénicos. Ver, por ej., Ali *et al.*, 1994, en la página 367. Los adenovirus no

parecen integrarse al genoma del huésped. Dado que existen fuera del cromosoma, se reduce notoriamente el riesgo de mutagénesis insercional. Ali *et al.*, 1994, en la página 373.

Los virus adeno-asociados exhiben ventajas similares a las de los vectores de base adenoviral. Sin embargo, los AVVs exhiben una integración sitio-específica en el cromosoma humano 19 (Ali *et al.*, 1994, en la página 377).

Terapia transcariótica

Una aproximación diferente a la terapia génica es la "terapia transcariótica", en la cual las células del paciente se tratan *ex vivo* para inducir a los genes latentes a producir la proteína de interés después de su reintroducción al paciente. La terapia transcariótica supone que el individuo tiene un complemento normal de genes necesario para la activación. La terapia transcariótica implica introducir un promotor u otra secuencia regulatoria exógena capaz de activar los genes incipientes en el ADN cromosómico de las células del paciente *ex vivo*, cultivar y seleccionar las células activas productoras de proteína y luego reintroducir las células activadas en el paciente con el propósito de que se tomen luego totalmente establecidas. Las células "con genes activados" fabrican luego la proteína de interés durante algún tiempo significativo, tal vez tanto como la vida entera del paciente. Las Patentes de los estados Unidos Nos. 5.641.670 y 5.733.761 describen en detalle este concepto.

Con el fin de que esta invención sea mejor entendida, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son sólo a los propósitos de ilustración, y no han de considerarse de ningún modo como limitantes del alcance de la invención. Todas las patentes, solicitudes de patente y referencias citadas en esta presentación se incorporan a la misma a modo de referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Metodología de síntesis de péptidos

Se siguió el siguiente procedimiento general para sintetizar algunos de los polipéptidos de la invención. Se llevó a cabo la síntesis de péptidos por medio de la estrategia FMOC/ter-Butil (Peptide Síntesis Protocols (1994), Volumen 35, por Michael W. Pennington & Ben M. Dunn) en condiciones de flujo continuo utilizando resinas PEG-Poliestireno Rapp-Polymere (Rapp-Polymere, Tubingen, Alemania). Al completarse la síntesis, los péptidos se separaron por ruptura de la resina y se desprotegieron usando TFA/DTT/H₂O/Triisopropil silano (88/5/5/2). Los péptidos se precipitaron del cóctel de ruptura utilizando dietil éter frío. El precipitado se lavó tres veces con el éter frío y luego se disolvió en ácido acético 5% antes de someterse a liofilización. La identidad de los péptidos se confirmó mediante cromatografía en fase reversa sobre una columna YMC-Pack ODS-AQ (YMC, Inc., Wilmington, NC) sobre un sistema Waters ALLIANCE® (Waters Corporation, Milford, MA) utilizando agua/acetonitrilo con TFA 3% como gradiente desde acetonitrilo 0% hasta 100%, y mediante espectrometría de masa MALDI en un Espectrómetro de Masa VOYAGER DE™ MALDI (modelo 5-2386-00, PerSeptive BioSystems, Framingham, MA). Se agregó la muestra del péptido en buffer de Matriz (d H₂O/acetonitrilo 50/50 con 3% de TFA) a buffer de Matriz 1/1. aquellos péptidos que no reunieron el criterio de pureza de >95% se purificaron mediante cromatografía en fase reversa sobre un sistema de HPLC Waters Delta Prep 4000 (Waters Corporation, Milford, MA).

Ejemplo 2

Clonación de péptidos

Para establecer un método sólido para expresar los polipéptidos de la invención y sus mutantes, se clonaron las secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de manera C-terminal a GST con un único sitio de reconocimiento del Factor Xa separando el péptido monomérico y el GST. El gen

que codifica el sitio de reconocimiento del Factor Xa fusionado a la secuencia de ADN del péptido a producir se ha sintetizado por hibridación de dos fragmentos de ADN mono-hebra superpuestos (70-90meros) conteniendo un sitio de enzima de restricción *Bam*HI o *Eco*RI inmediatamente 5' a la secuencia de ADN del polinucleótido a clonar, seguido de síntesis de ADN de las hebras opuestas a través del gran fragmento de la ADN polimerasa I (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD).

La secuencia de ADN elegida para cada polinucleótido se basó en la traducción reversa de la secuencia de aminoácidos designada de cada péptido. En algunos casos, el polinucleótido que codifica al péptido se genera por mutagénesis de PCR (Picard et al., *Nucleic Acids Res* 22: 2587-91, 1994; Sambrook et al. (1989) *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2da. Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) de un polinucleótido ya preparado por el método descrito anteriormente. El producto de doble hebra se digiere luego por medio de *Bam*HI y *Eco*RI y se liga al pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech), que también se ha obtenido por ruptura con *Bam*HI y *Eco*RI.

Por ejemplo, cuando la secuencia de ADN del polipéptido identificado como SEC ID NO:7 se clonó en el pGEX-6P-1, se expresó la siguiente secuencia de polipéptido en forma de fusiones con glutatión S-transferasa (GST): IEGRHSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIWLVKGRG (SEC ID NO:33), en la cual los primeros 4 aminoácidos, IEGR, son el sitio de reconocimiento del factor Xa y los restantes 31 aminoácidos son la secuencia de aminoácidos identificada como SEC ID NO:7.

Los primeros y últimos seis nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico que codifica al polipéptido identificado como SEC ID NO:7, representan los sitios de la enzima de restricción (*Bam*HI y *Eco*RI) utilizados para la clonación al

plásmido pGEX-6P-1 (FIG. 1). La secuencia "TAATGA" que precede inmediatamente al sitio *EcoRI* ("GAATTC") codifica dos codones de terminación. El resto de la secuencia de ADN codifica el Factor Xa-polipéptido identificado como secuencia de fusión de SEC ID NO:7.

Ejemplo 3

Expresión recombinante de péptidos y purificación

Células BL21 (DE3) (Stratagene) transformadas con un péptido GST de fusión que contenía plásmidos, se cultivaron a 37°C hasta alcanzar una DO_{600} de entre 0,6 y 1,0 y se indujeron mediante IPTG (Life Technologies) 1 mM durante 2 horas a 37°C. Se centrifugaron dos litros de células a 7.700xg durante 15 minutos y se conservaron a -20°C. El pellet de células se resuspendió en 80 ml de reactivo para extracción de proteínas bacterianas B-PER (Cat No. 78248, Pierce) e Inhibidor de Proteasas Completo (Roche) 1x hasta que la suspensión de células se homogeneizó. La mezcla homogénea se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se agregaron lisosoma y Dnasa I hasta una concentración final de 200 µg/ml y 10 µg/ml para solubilizar más las proteínas y para reducir la viscosidad, respectivamente. La mezcla se incubó durante 5 minutos adicionales. Los restos de células se eliminaron por centrifugación a 27.000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se mezcló con 2 mL de resina Glutathión Sefarosa 4B (Pharmacia) en un agitador durante toda la noche a 4°C. la resina se separó por centrifugación a 1.500 g durante 15 minutos, se rellenó en Columnas de Cromatografía Poly-Prep (Bio-Rad), se lavó con 30 mL de PBS seguido de 10 mL de buffer de Factor Xa ($CaCl_2$ 1 mM, NaCl 100 mM y Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Los péptidos se separaron de la columna con 60 unidades de Factor Xa (Pharmacia) en 1 mL de buffer de Factor Xa, durante toda la noche a 4°C. Estos eluatos se corrieron luego en HPLC de C18 (Beckman System Gold) usando un bucle de 2 mL y un caudal de flujo de 1 mL/minuto con el siguiente

programa: 5 minutos de Buffer A (TFA/H₂O 0,1%), 30 minutos de gradiente hasta 100% de Buffer B (TFA/ACN 0,1%), 10 minutos de Buffer A, 10 minutos de gradiente y 10 minutos de Buffer A. Las fracciones correspondientes a los picos (0,5 mL cada una) se recogieron y separaron mediante electroforesis en gel de Tricine-SDS 10-20%. La identidad de cada péptido se confirmó mediante espectrometría de masa utilizando la masa predicha a partir de la secuencia de aminoácidos. Los rendimientos típicos son de aproximadamente 50 µg de péptidos libres por litro de cultivo de *E. coli*. Se ha demostrado que los péptidos recombinantes tienen las mismas actividades que sus versiones sintéticas.

La siguiente tabla, Tabla 2, contiene algunos polipéptidos preparados de conformidad con el protocolo de síntesis de péptidos discutido más arriba (Ejemplo 1) o, en forma recombinante como se describió anteriormente.

Tabla 2

Glucagón	HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT (SEC ID NO:1)
GLP-1(7-36)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO:2)
GLP-1(7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO:3)
G1	HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLKGR-NH ₂ (SEC ID NO:4)
G5	HSQGTFTSDYSKYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO:5)
G27	HSQGTFTSDYAKYLDARHAKKEFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO:6)
G51	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO:7)
G55	HSQGTFTSDYARYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO:8)
G56	HSQGTFTSDYAAAYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO:9)
G57	HSQGTFTSDYAKYLDAAAKEFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO:10)
G58	HSQGTFTSDYAKYLDAKAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO:11)
G59	HSQGTFTSDYARYLDAKAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO:12)
G60	HSQGTFTSDYAKYLDAKAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO:13)
G61	HSQGTFTSDYARYLDAKAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO:14)

G71	HSQGTFTSDYAKYLDARRACEFIAWLVKGRG (SEC ID NO:115)
G74	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVCGRG (SEC ID NO:16)
G75	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKCRG (SEC ID NO:17)
G76	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGCG (SEC ID NO:18)
G77	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRC (SEC ID NO:19)
G277	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRC (22 kD) (SEC ID NO:20)
G82	HSQGTFTSDYARYLDARRAKEFIAWLVRGRG (SEC ID NO:21)
G83	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRG (SEC ID NO:22)
G84	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIAWLVKGRG (SEC ID NO:23)
G85	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIAWLVRGRGK (SEC ID NO:24)
G185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRG (SEC ID NO:25)
G2185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRG (22kD) (SEC ID NO:26)
G4185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRG (43kD) (SEC ID NO:27)
G87	HSQGTFTSDYAKYLDARRAK(FA)EFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO:28)
G88	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRK(FA) (SEC ID NO:29)
G90	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIK(FA)WLVGRG (SEC ID NO:30)
G182	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRGK(FA) (SEC ID NO:31)
G183	HSQGTFTSDYARYLDARRAK(FA)EFIKWLVGRG (SEC ID NO:32)

(FA): palmitato C₁₆ unido al residuo de lisina.

(22kD): PEG de 22kD unido al residuo de cisteína.

(43kD): PEG de 43kD unido al residuo de cisteína.

Ejemplo 4

Preparación de membranas de células RINm5F

Matraces conteniendo células RINm5F se lavaron con PBS, se disgregaron en un buffer Hepes 20 mM-EDTA 1 mM-sacarosa 250 mM conteniendo inhibidores de proteasas (HES) y se homogeneizaron en un homogeneizador dounce, seguido de resuspensión repetida a través de una aguja de medida 23.

las células y núcleos intactos se eliminaron por centrifugación a 500xg durante 5 minutos. El pélet se resuspendió en buffer HES usando una aguja de medida 23 y se repitió la centrifugación. Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se combinaron y se centrifugaron a 40.000xg durante 20 minutos. El pélet de membranas plasmáticas resultante se resuspendió en buffer HES usando una aguja de medida 23, seguida de una aguja de medida 25. Las membranas se conservaron a -80°C hasta ser utilizadas.

Ejemplo 5

Preparación de membranas plasmáticas de hígado de rata

Se sacrificaron ratas y se extrajeron sus hígados colocándolos en buffer TES (Tris 20 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, sacarosa 255 mM conteniendo inhibidores de proteasas) enfriado con hielo. Se determinó el peso húmedo de los hígados y se molió el tejido en 5 volúmenes de buffer TES enfriado con hielo y se preparó una suspensión utilizando un politrón. Todos los buffers y agitadores se conservaron a 4°C . La suspensión se homogeneizó adicionalmente usando tres golpes de un homogeneizador dounce manual. El homogenato se pasó a través de varias capas de estopa y se centrifugó a 25.000 x g durante 10 minutos. Los pélets se homogeneizaron en 22,1 ml de buffer TES utilizando 10 golpes de un homogeneizador dounce manual. Se agregaron veintisiete mililitros y nueve décimas de sacarosa 2,4 M en TE y se mezcló bien. El homogenato se distribuyó en varios tubos y cada tubo se cubrió con 7 ml de buffer TES. Los tubos se centrifugaron a 120.000 x g durante 60 minutos. Las membranas plasmáticas se retiraron de la interfase que se formó durante el centrifugado, se diluyeron en TES y se concentraron usando una centrifugación de 15 minutos a 200.000 x g. El pélet resultante se homogeneizó otra vez en 9,8 ml de buffer TES, se combinó con 10,3 ml de sacarosa 2,4 M, se cubrió con 7 ml de TES y se centrifugó a 180.000 x g durante 30 minutos. Las membranas plasmáticas se retiraron de la

interfase, se diluyeron con TES y se recogieron por centrifugación a $200.000 \times g$ durante 15 minutos. El pélet final se resuspendió en TES. Las membranas plasmáticas se conservaron a -80°C hasta estar listas para su uso.

Ejemplo 6

Preparación de hepatocitos de rata

Se aislaron hepatocitos de acuerdo con un procedimiento modificado de Berry y Friend (*J. Cell Biol.* 43:506, 1969). Se anestesió con pentobarbital sódico (55 mg/kg, i.p.) una rata Wistar macho. La rata se colocó sobre su lomo en la bandeja del aparato de perfusión hepática (37°C) y sus miembros se aseguraron con cinta de laboratorio. La superficie ventral se limpió con alcohol 70% y la cavidad abdominal se abrió con tijeras para exponer el hígado, la vena porta, la arteria hepática y la vena cava posterior. Se colocaron ligaduras holgadas alrededor de los tres vasos. Se insertó una cánula en la vena porta y se aseguró con la ligadura. La arteria hepática y la vena cava posterior por debajo del hígado se ataron con las ligaduras. La bomba de perfusión se encendió y la aorta descendente se seccionó inmediatamente para permitir que el buffer escapara y se desangrara la rata. La cavidad torácica se abrió rápidamente para exponer el corazón. Se insertó una cánula en la vena cava superior a través del corazón y se aseguró con una ligadura para completar la circulación del buffer a través del hígado. El hígado se perfundió con buffer Krebs-Henseleit conteniendo 5 – 10% de RBC de oveja y bajo un caudal constante de 95% de O_2 /5% de CO_2 *in situ* con un caudal de 14 ml/minuto. Se perfundió en un sistema no circulante durante 5 minutos y luego se continuó con un sistema de recirculación (con 30 mg de colagenasa) durante otros 30 minutos. Luego se extrajo el hígado, se molió con tijeras en un vaso de plástico y se filtró a través de un tamiz de nylon. Los hepatocitos se separaron del material de desecho mediante una serie de lavados con buffer y centrifugaciones (690 rpm, temperatura ambiente, 90 segundos). Se

diluyó con buffer una alícuota de células, se tiñó con Trypan Blue 0,4% y se hizo un recuento. El resto de las células se diluyó con buffer hasta una densidad apropiada para cada ensayo.

Ejemplo 7

Protocolo para aislamiento de islotes de rata

Se usaron ratas Sprague Dawley (275-320 g) como fuente donante de islotes. En resumen, el páncreas se llenó con 10 ml de Liberasa RI (Boehringer Mannheim) reconstituida, se cosechó y se incubó con 5 ml adicionales de solución enzimática en un baño de agua durante 30 minutos. La suspensión de tejido se lavó dos veces con buffer FBS/Hanks (Gibco) 10% frío, se resuspendió en 8 ml de ficoll 25% (Sigma) y luego se dispuso en capas de 5 ml cada una de ficoll 23%, 20% y 11%. Los islotes de la capa de 20% después de la centrifugación se retiraron, se lavaron dos veces con buffer FBS/Hanks 10% frío y se resuspendieron en medio FBS/RPMI 10% (Sigma).

Ejemplo 8

Unión competitiva del péptido al receptor del GLP-1 en membranas plasmáticas de células RINm5F

Los valores de IC_{50} para la unión competitiva de los polipéptidos y de los fragmentos, variantes y análogos de polipéptidos de la invención al receptor del GLP-1 en membranas de RINm5F están típicamente al menos entre aproximadamente 0,01 nM y aproximadamente 20 nM (es decir, 0,01, 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nM). Los valores de IC_{50} para los derivados de polipéptidos de la invención están típicamente al menos entre aproximadamente 0,01 nM y aproximadamente 500 nM (es decir, 0,01, 0,1, 1, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 ó 500 nM).

La unión competitiva de algunos polipéptidos de la invención a las membranas de células RINm5F se midió de la siguiente manera. Se bloquearon

placas de filtración GF/C de noventa y seis pocillos (Millipore, Bedford, MA) con PEI 0,3% durante al menos una hora y se lavaron dos veces con buffer de unión que consistía en Tris 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5, BSA 1 mg/ml y bacitracina 1 mg/ml. Se aplicaron a cada pocillo cinco microgramos de membranas plasmáticas de células RINm5F diluídas en buffer de unión junto con GLP-1 marcado con ^{125}I de 0,05 μCi y concentraciones de péptidos que oscilaban entre 1×10^{-12} y 1×10^{-6} M. Luego de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS enfriado con hielo que contenía 1 mg/ml de BSA. Las placas se secaron, se agregó reactivo de centelleo a cada pocillo y se determinaron las cpm por pocillo usando un contador Wallac Microbeta.

El número de cuentas de ^{125}I unido a las membranas para cada concentración de péptido se graficó y analizó por regresión no lineal utilizando el programa Prism para determinar los IC_{50} . Los polipéptidos expuestos en la tabla 2 se unieron al receptor del GLP-1 presente en las membranas plasmáticas aisladas de células RINm5F con valores de IC_{50} de entre 1,4 nM y 248 nM (determinados a partir de un mínimo de tres ensayos). IC_{50} es la concentración de un polipéptido para la cual la unión máxima del GLP-1 (7-36) (SEC ID NO:2) marcado se reduce en un 50%.

Ejemplo 9

Unión competitiva del péptido al receptor del glucagón en membranas plasmáticas de hígado de rata

Los valores de IC_{50} para la unión competitiva de los polipéptidos y de los fragmentos, variantes y análogos de polipéptidos de la invención al receptor del glucagón en membranas de hígado de rata están típicamente al menos entre aproximadamente 0,1 nM y aproximadamente 1000 nM (es decir, 0,1, 1, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 ó 1000 nM).

La unión competitiva de algunos polipéptidos de la invención a las membranas de hígado de rata se midió de la siguiente manera. Se bloquearon placas de filtración GF/C de noventa y seis pocillos (Millipore, Bedford, MA) con PEI 0,3% durante al menos una hora y se lavaron dos veces con buffer de unión que consistía en Tris 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5, BSA 1 mg/ml y bacitracina 1 mg/ml. Se aplicaron a cada pocillo tres microgramos de membranas plasmáticas de hígado de rata diluidas en buffer de unión junto con glucagón marcado con ^{125}I de 0,05 μCi y concentraciones de péptidos que oscilaban entre 1×10^{-12} y 1×10^{-5} M. Luego de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS enfriado con hielo que contenía 1 mg/ml de BSA. Las placas se secaron, se agregó reactivo de centelleo a cada pocillo y se determinaron las cpm por pocillo usando un contador Wallac Microbeta.

El número de cuentas de ^{125}I unido a las membranas para cada concentración de péptido se graficó y analizó por regresión no lineal utilizando el programa Prism para determinar los IC_{50} . Los polipéptidos expuestos en la tabla 2 se unieron al receptor del glucagón presente en las membranas plasmáticas aisladas de hígado de rata con valores de IC_{50} de entre 11,7 nM y 726 nM (determinados a partir de un mínimo de tres ensayos). IC_{50} es la concentración de un polipéptido para la cual la unión máxima del glucagón marcado se reduce en un 50%.

Ejemplo 10

Medición de la señalización de péptidos a través del receptor del GLP-1 utilizando el ensayo de proximidad por centelleo (SPA) del AMP cíclico

Para polipéptidos y fragmentos, variantes y análogos de polipéptidos de la invención, la "activación" del receptor del GLP-1 en un ensayo de proximidad por centelleo del cAMP es la inducción de una actividad máxima que sea al menos entre aproximadamente 80% y aproximadamente 200% (es decir, 85, 90, 95, 100,

105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 ó 200 %) de la máxima actividad inducida por el GLP-1(7-36) (SEC ID NO:2) nativo, con una potencia relativa de al menos entre un 4% y aproximadamente 1000% (es decir, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ó 1000%). Para derivados de polipéptidos de la invención, la "activación" del receptor del GLP-1 en un ensayo de proximidad por centelleo del cAMP es la inducción de una actividad máxima que sea al menos entre aproximadamente 80% y aproximadamente 200% (es decir, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 ó 200 %) de la máxima actividad inducida por el GLP-1(7-36) (SEC ID NO:2) nativo, con una potencia relativa de al menos entre un 0,5% y aproximadamente 1000% (es decir, 0,5, 1, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ó 1000%). La "potencia relativa" es la EC_{50} del GLP-1(7-36) (SEC ID NO:2) nativo dividida por la EC_{50} de un polipéptido de la invención, multiplicado por 100. " EC_{50} " es la concentración de un polipéptido para la cual se alcanza el 50% de la actividad máxima.

La señalización de péptidos del receptor del GLP-1 para algunos polipéptido de la invención utilizando el ensayo de proximidad por centelleo del cAMP, se midió de la siguiente manera. Se plaquearon células RINm5F en placas de 96 pocillos (Costar) a razón de $1,5 \times 10^6$ células/pocillo y se cultivaron a 37°C durante 24 horas en RPMI 1640, FBS 5%, antibiótico/antimicótico (Gibco BRL). El medio se retiró y las células se lavaron dos veces con PBS. Las células se incubaron con concentraciones de péptidos que oscilaban entre 1×10^{-12} y 1×10^{-6} M en Hépés-PBS que contenía BSA 1% e IBMX 100 μ M durante 15 minutos a 37°C. Para probar los péptidos conjugados con ácido graso, se omitió el BSA del buffer de incubación. Se retiró el buffer de incubación y las células se lisaron en el reactivo de lisado provisto con el sistema de ensayo de detección directa del

Ensayo de Proximidad por Centelleo del cAMP (SPA) (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ). La cantidad de cAMP (en pmol) presente en los lisados se determinó siguiendo las instrucciones provistas con el equipo.

La cantidad de cAMP (en pmol) producido para cada concentración de péptido se graficó y analizó por regresión no lineal utilizando el programa Prism APRA determinar la EC_{50} para cada péptido. El valor de potencia relativa promedio para la activación del receptor del GLP-1 para los polipéptidos expuestos en la Tabla 2 estuvo entre el 0,6% y el 76,1%. La máxima actividad inducida osciló entre el 83% y el 132% del péptido nativo GLP-1(7-36) (SEC ID NO:2) (determinada a partir de un mínimo de tres ensayos). Ver la Tabla 4.

Ejemplo 11

Medición de la señalización de péptidos a través del receptor del glucagón utilizando el ensayo de proximidad por centelleo (SPA) del AMP cíclico

Para polipéptidos y fragmentos, variantes y análogos de polipéptidos de la invención, la "activación" del receptor del glucagón en un ensayo de proximidad por centelleo del cAMP es la inducción de una actividad máxima que sea al menos entre aproximadamente 0% y aproximadamente 75% (es decir, 0, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, ó 75%) de la máxima actividad inducida por el glucagón nativo, con una potencia relativa de al menos entre aproximadamente 0,001% y aproximadamente 5% (es decir, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 2, 3, 4 ó 5%). Para derivados de polipéptidos de la invención, la "activación" del receptor del glucagón en un ensayo de proximidad por centelleo del cAMP es la inducción de una actividad máxima que sea al menos entre aproximadamente 0% y aproximadamente 40% (es decir, 0, 1, 10, 20, 30 ó 40%) de la máxima actividad inducida por el glucagón nativo, con una potencia relativa de al menos entre aproximadamente un 0,001 y aproximadamente un 1% (es decir, 0,001, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 ó 1%). La "potencia relativa" es la EC_{50} del

después de un período de incubación y las células se lisaron en el reactivo de

glucagón nativo (SEC ID NO:1) dividida por la EC_{50} de un polipéptido de la invención, multiplicado por 100. " EC_{50} " es la concentración de un polipéptido para la cual se alcanza el 50% de la actividad máxima.

La señalización de péptidos del receptor del glucagón para algunos polipéptidos de la invención, utilizando el ensayo de proximidad por centelleo del cAMP, se midió de la siguiente manera. Se plaquearon hepatocitos de ratas aislados recientemente en placas de 96 pocillos a razón de $7,5 \times 10^4$ ó 2×10^5 células/pocillo en Hepes-bicarbonato que contenía 1% de BSA e IBMX 100 μ M. luego del equilibrado a 37°C en un medio de 5% de CO_2 /95% de O_2 durante 10 minutos, se agregaron péptidos en concentraciones que oscilaban entre 1×10^{-12} y 1×10^{-5} M durante otros 15 minutos. Las placas se centrifugaron brevemente, se retiró el buffer de incubación y las células se lisaron en el reactivo de lisado provisto con el sistema de ensayo de detección directa del Ensayo de Proximidad por Centelleo del cAMP (SPA) (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ).

La cantidad de cAMP (en pmol) presente en los lisados se determinó siguiendo las instrucciones provistas con este equipo. La cantidad de cAMP (en pmol) producido para cada concentración de péptido se graficó y analizó por regresión no lineal utilizando el programa Prism APRA determinar la EC_{50} para cada péptido. El valor de potencia relativa promedio (relación entre la concentración del glucagón y la concentración del polipéptido para una respuesta del 50% (EC_{50}) x 100, determinado a partir de un mínimo de tres ensayos) para la activación del receptor del glucagón para los polipéptidos de la invención fue <5%. La máxima actividad inducida osciló entre el 28,3% y el 71,3% del péptido nativo glucagón (determinada a partir de un mínimo de tres ensayos).

La capacidad del péptido híbrido para inhibir la actividad del glucagón se midió de la siguiente manera: luego del equilibrado a 37°C en un medio de 5% de

CO₂/95% de O₂ durante 10 minutos, se agregó péptido 10 μ M a las células, seguido inmediatamente de una concentración submáxima de glucagón durante 15 minutos. Luego las células se lisaron y se determinó el cAMP como se describió anteriormente.

Luego de restar la cantidad de cAMP producida en los hepatocitos no estimulados de cada punto tomado como dato, se calculó la inhibición porcentual de la siguiente manera: la inhibición porcentual es la cantidad de cAMP producida en presencia de glucagón submáximo solo menos la cantidad de cAMP producida en presencia de glucagón submáximo y péptido 10 μ M, dividido por la cantidad de cAMP producida en presencia de glucagón submáximo solo, y multiplicado por 100. La inhibición porcentual promedio de la actividad del glucagón por parte de los polipéptidos expuestos en la Tabla 2 se ubicó entre el 11,3% y el 59% (determinada a partir de un mínimo de tres ensayos). Ver la Tabla 4.

Ejemplo 12

Medición de la liberación de glucosa de hepatocitos de rata

La inhibición de la producción de glucosa mediada por glucagón, medida por la liberación de la glucosa de hepatocitos de rata, se ubica típicamente al menos entre aproximadamente un 20% de inhibición y aproximadamente un 100% de inhibición (es decir, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100%).

La inhibición de la producción de glucosa mediada por glucagón por parte de algunos polipéptidos de la invención, se midió de la siguiente manera. Se agregaron hepatocitos de rata a una placa de fondo plano de 96 pocillos (2×10^5 /100 μ l/pocillo) y se pre-incubaron en una incubadora a 37°C con agitación constante y bajo un flujo de 95% de O₂/5% de CO₂ durante 10 minutos. Los hepatocitos se incubaron durante otros 30 minutos después del agregado de glucagón con o sin péptido. Las células se lisaron luego con ácido perclórico 15% y las placas se centrifugaron a 2600 rpm, a 4°C durante 15 minutos. El

sobrenadante se neutralizó con Tris-HCl 1M (pH 8,0): KOH 2,5 N (45:55) y se centrifugó otra vez. En el sobrenadante resultante se analizó la glucosa con hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Methods of Enzymatic Analysis, H.U. Bernmeyer, Ed., Academic Press) y se leyó la A_{340} en un lector de placas tMAX (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

La liberación de glucosa se calculó después de restar la cantidad de glucosa producida en el hepatocito no estimulado de cada punto tomado como dato y se calculó la inhibición porcentual. La inhibición porcentual es la cantidad de glucosa producida en presencia de glucagón 1nM solo menos la cantidad de glucosa producida en presencia de glucagón 1 nM y péptido 100 nM, dividido por la cantidad de glucosa producida en presencia de glucagón 1nM solo, y multiplicado por 100. El polipéptido que posee la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID NÚ:6 inhibió la producción de glucosa mediada por glucagón en un 47%, según se determinó en 3 ensayos. Ver la Tabla 2.

Ejemplo 13

Medición de la secreción de insulina por islotes de ratas perfundidas

El incremento de la secreción de insulina por parte de los islotes de ratas perfundidas es un incremento de al menos 1,5 veces. El componente agonista del receptor del GLP-1 de los polipéptidos de la invención incrementa la secreción de insulina de los islotes perfundidos al menos entre 1,5 veces y aproximadamente 10 veces (es decir, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ó 10 veces).

La secreción de insulina por parte de los islotes de ratas perfundidas mediada por algunos péptidos de la invención se midió de la siguiente manera. Las respuestas bifásicas de la liberación de insulina estimulada por estos polipéptidos se ensayaron mediante la perfusión de los islotes. Se cargaron cincuenta islotes en la cámara de perfusión y se perfundieron con HEPES-KRB que contenía glucosa 3 mM a 37°C. Después de 60 minutos, los islotes se

expusieron a un buffer que contenía glucosa 8 mM con o sin péptido (50 nM) y se perfundieron durante otros 30 minutos. Las fracciones del perfusato se recogieron a intervalos de 1 ó 5 minutos para la determinación de la insulina. La insulina se midió utilizando un equipo de ELISA (Alpco Diagnostics, Windham, NH). A una concentración de 50 nM, el polipéptido que posee la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID NO:6 incrementó la secreción de insulina de los islotes perfundidos aproximadamente 2 veces, que es equivalente a lo logrado por el GLP-1 50 nM.

Ejemplo 14

Secreción de insulina de células dispersas de islotes de rata

El incremento de la secreción de insulina por parte de células dispersas de islotes de ratas, en este ensayo, es un incremento de al menos 1,5 veces. El componente agonista del receptor del GLP-1 de dichos polipéptidos de la invención incrementa la secreción de insulina de células dispersas de islotes al menos entre 1,5 veces y aproximadamente 10 veces (es decir, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ó 10 veces).

La secreción de insulina por parte de células dispersas de islotes de ratas mediada por una cantidad de péptidos de la invención se midió de la siguiente manera. Se aislaron islotes de Langerhans de ratas SD (200-250 g) a través de un procedimiento de digestión que utiliza colagenasa. Las células dispersas de los islotes se prepararon mediante tratamiento con tripsina, se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo en forma de V y se peletizaron. Las células se cultivaron durante toda la noche en un medio. El medio se aspiró y las células se pre-incubaron con buffer Krebs-Ringer-HEPES que contenía glucosa 3mM durante 30 minutos a 37°C. El buffer de pre-incubación se retiró y las células se estimularon con buffer Krebs-Ringer-HEPES que contenía la concentración de glucosa adecuada (por ej. 8 mM), con y sin péptidos, durante un tiempo adecuado a 37°C.

En algunos estudios, también se incluye una concentración apropiada de GLP-1. Se retiró una porción de sobrenadante y se midió su contenido en insulina por medio de SPA. Los resultados se expresan como factor por encima del control (FOC). A una concentración de 50 nM, el polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID NO:27 incrementó la secreción de insulina de las células dispersas de los islotes en aproximadamente 3 veces. Ver Tabla 2.

Ejemplo 15

Medición de la producción de glucosa estimulada por glucagón en ratas Wistar alimentadas

La inhibición de la producción de glucosa estimulada por glucagón en este ensayo es una inhibición de por lo menos el 20%. El componente antagonista del receptor del glucagón de los polipéptidos de la invención inhibe la elevación de la glucosa sanguínea mediada por el glucagón, según se mide a través de la producción de glucosa estimulada por glucagón en ratas Wistar alimentadas, en al menos una inhibición entre el 20% y aproximadamente el 100% de inhibición (es decir, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100%).

La producción de glucosa estimulada por glucagón en ratas Wistar alimentadas por algunos polipéptidos de la invención, se midió de la siguiente manera. Se anestesiaron por un breve lapso ratas Wistar macho con gas isoflurano, se les extrajo sangre de la cola para medir la glucemia utilizando un Glucometer y luego se les aplicó una inyección en la vena de la cola de cada vehículo (0,9% de solución salina + albúmina humana 1%), 0,29 nmol/kg de glucagón, 1 nmol/kg de polipéptidos de la invención o glucagón + polipéptido de la invención. Se retiró la anestesia y a las ratas conscientes se les extrajo sangre nuevamente después de 10, 20 y 30 minutos.

Se determinó la inhibición de la glucosa analizando el área bajo la curva de glucosa después de restar el nivel de glucosa basal (dABC). La inhibición porcentual se define como la cantidad de glucosa producida por 0,3 nmol/kg de glucagón solo menos la cantidad de glucosa producida por 0,3 nmol/kg de glucagón en presencia de 1 nmol/kg de péptido híbrido, dividido por la cantidad de glucosa producida por 0,3 nmol/kg de glucagón solo, y multiplicado por 100.

El glucagón solo elevó los niveles de glucosa sanguínea mientras que los polipéptidos de la invención solos no tuvieron efecto sobre los niveles de glucosa sanguínea. El polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID NO:6 inhibió la elevación de la glucosa sanguínea mediada por glucagón en un 63%. Ver la Tabla 2.

Ejemplo 16

Medición de la producción de glucosa estimulada por glucagón en ratones Balb/C alimentados

La inhibición de la producción de glucosa en este ensayo es una inhibición de por lo menos aproximadamente el 20%. Con preferencia, el componente antagonista del receptor del glucagón de los polipéptidos de la invención inhibe la elevación de la glucosa sanguínea mediada por el glucagón en ratones, según se mide a través de la producción de glucosa estimulada por glucagón en ratones Balb/C alimentados, entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 100% (es decir, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100%).

La producción de glucosa estimulada por glucagón en ratones Balb/C alimentados por algunos polipéptidos de la invención, se midió de la siguiente manera. A ratones Balb/C machos se les suministró vehículo (0,9% de solución salina + albúmina humana 1%) o 100 µg/kg de polipéptido derivatizado por inyección subcutánea 17 horas antes de la provocación con glucagón. Al día siguiente los ratones se sometieron a ayuno durante 2 horas antes de recibir una

inyección endovenosa de 10 µg/kg de glucagón o vehículo en la vena de la cola. Se extrajo a los ratones sangre de la cola para la determinación de glucosa utilizando un Glucometer justo antes de la inyección de glucagón y nuevamente 15 minutos después.

Se calculó el cambio en la glucosa luego de los 15 minutos para cada ratón. Luego el cambio promedio en la glucosa del grupo tratado con vehículo se restó del cambio en la glucosa para cada ratón en los grupos tratados para obtener el cambio en la glucosa debido al glucagón. La inhibición porcentual se define como la cantidad de glucosa producida por 10 µg/kg de glucagón solo menos la cantidad de glucosa producida por µg/kg de glucagón en presencia de 100 µg/kg de péptido inhibido, dividido por la cantidad de glucosa producida por 100 µg/kg de glucagón solo, y multiplicado por 100. Ver la Tabla 3.

Tabla 3

Grupo	Glucosa (mg/dl)					
	0 min.	15 min.	Delta (15-0)	-Vehículo delta	% de 10 µg/kg de Glucagón	% de Inhibición
Vehículo	92	108	16			
10 µg/kg de glucagón	95	195	100	84	100	
10 µg/kg de glucagón + 100 µg/kg de polipéptido (SEC ID NO:27)	75	150	75	59	69	31

Ejemplo 17

Medición de los aumentos en los niveles plasmáticos de insulina durante el ensayo de tolerancia a la glucosa in vivo (IVGTT) en ratas Wistar sometidas a ayuno

Un aumento en los niveles plasmáticos de insulina en este ensayo es de por lo menos un factor 2. Con preferencia, el componente agonista del receptor del GLP-1 de los polipéptidos de la invención aumenta la secreción de insulina en

ratas, según se mide a través de un aumento en los niveles plasmáticos de insulina durante el ensayo de tolerancia a la glucosa *in vivo* en ratas Wistar sometidas a ayuno, en un factor entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5, con mayor preferencia entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10, y, con mayor preferencia aún, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20 (es decir, en un factor 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20).

Los niveles plasmáticos de insulina durante el ensayo de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar sometidas a ayuno por algunos polipéptidos de la invención, se midieron de la siguiente manera. Ratas Wistar macho se sometieron a ayuno durante toda la noche y luego se anestesiaron con gas isoflurano. A las ratas se les aplicó una inyección en la vena de la cola de 0,4 g/kg de glucosa más vehículo (0,9% de solución salina + albúmina humana 1%) ó 1 nmol/kg de GLP-1 (control positivo) ó 1 nmol/kg de polipéptidos de la invención. Se extrajo sangre del ojo de las ratas un minuto después y se determinó la insulina en el plasma utilizando un equipo de ELISA (Alpco Diagnostics (Windham, NH)). A una concentración de 1 nmol/kg, el polipéptido que tenía la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID NO:6 promovió la secreción de insulina en un factor 3-4, lo cual es equivalente al logrado por 1 nmol/kg de GLP-1. Ver la Tabla 2.

Ejemplo 18

Efecto de los péptidos de la invención en el ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) en ratas o ratones

Una disminución en los niveles de glucosa sanguínea medidos en este ensayo es una disminución de por lo menos aproximadamente un 10%. Con preferencia, el componente agonista del receptor del GLP-1 de los polipéptidos de la invención disminuye los niveles de glucosa sanguínea, según se mide a través del ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en ratas o ratones, entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 60%, con mayor preferencia

entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 80%, y , con mayor preferencia aún, entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 100% (es decir, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100%).

Los niveles de glucosa sanguínea durante el ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal por algunos polipéptidos de la invención, se midieron de la siguiente manera. Se examinó en ratos o ratones la actividad *in vivo* de los polipéptidos de la invención cuando se los administra en forma subcutánea. Las ratas o ratones mantenidos en ayunas toda la noche recibieron una inyección subcutánea de control o péptido (100 µg/kg). Se midió la glucosa sanguínea basal antes de la administración de los péptidos o tres o 17 horas después de la administración de los péptidos derivatizados, y las ratas o ratones recibieron 2 g/kg de glucosa en forma intraperitoneal. Se midió la glucosa sanguínea otra vez después de 15, 30 y 60 minutos en ratas o después de 30 y 60 minutos en ratones.

Los péptidos de la invención redujeron en forma significativa los niveles de glucosa sanguínea con respecto al vehículo luego del IPGTT, con una reducción del 13%-54% en el ABC de la glucosa. Esto demuestra que los péptidos tienen una prolongada actividad depresora de la glucosa y una prolongada vida media *in vivo*. el GLP-1 tiene una vida media muy corta *in vivo* (< 10 min.). La capacidad de los péptidos de la invención para disminuir la glucosa sanguínea 3 horas después de la administración del péptido es una clara indicación de que el péptido está presente en la circulación en este instante y por ello tiene una prolongada vida media respecto del GLP-1.

Ejemplo 19

Incorporación de PEG a los péptidos

La incorporación de PEG puede efectuarse por cualquier método conocido por los expertos en el arte. Sin embargo, en esta instancia, la incorporación de

PEG se llevó a cabo introduciendo una única mutación de cisteína en el péptido seguido de incorporación del PEG a la cisteína por medio de un enlace tioéter estable entre el sulfhidrilo del péptido y el grupo maleimida del reactivo metoxi-PEG-maleimida (Inhale/Shearwater). Es preferible introducir la única cisteína en el extremo C-terminal del péptido para minimizar la potencial reducción de la actividad por incorporación del PEG.

Específicamente, se agregó un exceso molar de 2 a 1 de reactivo mPEG-mal. (PM 22 kD y 43 kD) a 1 mg de péptido (por ej. SEC ID NO:25 con una mutación de cisteína en el extremo C-terminal del péptido) y se disolvió en buffer de reacción a pH 5 (fosfato de Na 0,1 M/ NaCl 0,1 M/ EDTA 0,1 M). después de 0,5 hora a temperatura ambiente, la reacción se frenó con un exceso doble de moles de DTT o de cisteína libre respecto del mPEG-mal. La mezcla de reacción péptido-PEG-mal se aplicó a una columna de intercambio catiónico para eliminar los reactivos de PEG residuales seguido de una columna de gel filtrante para eliminar el péptido libre residual. Se determinaron la pureza, la masa molecular y el número de sitios con PEG incorporado por medio de SDS-PAGE y espectrometría de masa MALDI-TOF. La incorporación de PEG con un PEG de menor tamaño (por ej. un PEG de 22 kD lineal) reducirá la actividad del péptido con menor probabilidad mientras que un PEG de mayor tamaño (por ej. un PEG de 43 kD ramificado) reducirá la actividad con mayor probabilidad. Sin embargo, el PEG de mayor tamaño incrementará la vida media plasmática en mayor medida de modo que sea posible una inyección una vez a la semana (Harris, *et al.*, PEGylation: A Novel Process for Modifying Pharmacokinetics, *Clin. Pharmacokinet* 40:539-551, 2001).

Ejemplo 20

Potencia relativa de los polipéptidos agonistas del receptor del GLP-1 y antagonistas del receptor del glucagón

La unión del GLP-1 (valores de IC_{50}) para los polipéptidos que se listan en la tabla 4 se determinó como se describe en el Ejemplo 8. Los valores de potencia relativa y de actividad porcentual del GLP-1 se calcularon como se describe en el Ejemplo 10. Se suministró a ratas o ratones 100 $\mu\text{g/kg}$ de péptido y a las 3 horas posteriores a la dosificación se determinó la disminución de los niveles de glucosa mediante el ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT), según se describe en el Ejemplo 18. Ver la Tabla 4.

La unión a las membranas hepáticas (valores de IC_{50}) para los polipéptidos que se listan en la tabla 4 se determinó como se describe en el Ejemplo 9. La inhibición porcentual del aumento del cAMP estimulado por glucagón se determinó como se describe en el Ejemplo 11. Se suministró a ratas o ratones 100 $\mu\text{g/kg}$ de péptido y a las 17 horas posteriores a la dosificación se determinaron los niveles de glucosa mediante los métodos de los Ejemplos 15 y 16 y que se informan en la tabla 4. Los polipéptidos de la invención funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón *in vivo*.

Péptido	GLP-1				Glucagón		
	IC_{50} de RIN (nM)	Potencia Relativa (%)	% GLP-1 máx.	Disminución de ABC en IPGTT <i>in vivo</i> (%) ^a	IC_{50} de Hígado (nM)	% de Inhib. del aumento del cAMP estimulado por glucagón	% de disminución de la glucosa sanguínea estimulada por glucagón ^b
Glucagón					1,8		
GLP-1	0,4	100	100				
G1	6	6,9	112,1		6,6		
G5	0,5	69,9	109,4		243,1		
G27	2,2	13,4	98,1		69,3	31	
G51	8,2	58,1	91,2		154,1	35,2	
G55	9,8	18,6	115,9		139,2	32,1	
G56	6,6	37,2	114,8		125,3	28,6	
G57	14,7	18,3	132,4		177,5	18,4	
G58	8,9	76,1	99,0		163,5	32,6	
G59	2,1	22,7	101,7		97,5	41,1	
G60	13,8	22,3	95,7		682	21,8	
G61	10,6	12,1	96,0		232	45,2	

G71	5,8	4,3	93,3		25,6	11,3		
G74	4,4	8,4	88,7		21,7	23,7		
G75	7,7	6,6	86,1		54,0	17,1		
G76	10,2	7,7	85		59,1	23,0		
G77	8,9	9,5	92,1		61,1	18,6		
G277	ND	1,8	93,7	46	63,5			
G82	8,1	29,9	97,1		33,6	30,2		
G83	3,2	29,9	89,4		28,6	24,7		
G84	1,4	61,8	113,9		11,7	25,2		
G85	1,5	64,5	95,8		16,1	27,9		
G185	4,5	13,0	103,9		48	32		
G2185	56,1	6,2	112,7	44	347			
G4185	248	0,7	98,3	36	547		31	
G87	98,6	6,1	100,4	13	620	59		
G88	109,0	2,3	118,3	16	350			
G90	25,4	0,8	83,5	13	726			
G182	12,6	1,4	104,4	14	220			
G183	158,7	0,6	90,5	27	663			

a = IPGTT en ratones 3 horas posteriores a la dosificación con 100 µg/kg de péptido

b = provocación con glucagón en ratones 17 horas posteriores a la dosificación con 100 µg/kg de péptido

ND = no determinado

LISTADO DE SECUENCIAS**<110> Pan, Clark****<120> Péptidos que actúan como agonistas del receptor GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón y sus métodos de uso farmacológico.****<130> 2973.00085****<160> 34****<170> PatentIn versión 3.1****<210> 1****<211> 29****<212> PRT****<213> Homo sapiens****<400> 1**

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	

Arg	Arg	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr
		20					25					

<210> 2**<211> 30****<212> PRT****<213> Homo sapiens****<220>****<221> MOU_RES****<222> (30)..(30)****<223> AMIDACIÓN****<400> 2**

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg
			20				25					30	

<210> 3

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 9
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)..(30)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 4

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 5
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)..(30)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 5

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 6
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30)..(30)
<223> AMIDACIÓN

<400> 6

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 7
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 7

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 8
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> AMIDACIÓN

<400> 8

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

<221> MOD RES

<222> (30)..(30)

<223> AMIDACIÓN

<900> 9

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Ala Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

<221> MOD RES

<222> (30)..(30) <223> AMIDACIÓN

<400> 10

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Ala Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 11

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 11

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 12

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 13

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 13

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Ala Lys Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 14

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 14

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Ala Lys Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 15

<211> 31 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 15

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Cys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 16

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 16

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Cys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 17

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 17

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Cys Arg Gly
20 25 30

<210> 18

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 18

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Cys Gly
20 25 30

<210> 19

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 19

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Cys
20 25 30

<210> 20

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Incorporación de PEG

<400> 20

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Cys
20 25 30

<210> 21

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 21

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 22

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220> 5 10 15
 <223> Secuencia Artificial

<400> 22

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 23
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 23

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 24
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 24

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Lys
 20 25 30

<210> 25
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 25

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Cys
 20 25 30

<210> 26

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Incorporación de PEG

<400> 26

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Cys
 20 25 30

<210> 27

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Incorporación de PEG

<400> 27

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala

1 5 10 15
Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Cys
 20 25 30

<210> 28
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30)..(30)
<223> AMIDACIÓN

<220>
<221> LÍPIDO
<222> (20)..(20)
<223> PALMITATO

<400> 28

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 29
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> LÍPIDO
<222> (31)..(31)
<223> PALMITATO

<400> 29

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Lys
 20 25 30

<210> 30

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

<221> LÍPIDO

<222> (24)..(24)

<223> PALMITATO

<400> 30

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 31

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

<221> LÍPIDO

<222> (32)..(32)

<223> PALMITATO

<400> 31

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Lys
 20 25 30

<210> 32

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

<221> LÍPIDO

<222> (24)..(24)

<223> PALMITATO

<400> 32

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 33

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 33

Ile Glu Gly Arg His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys
1 5 10 15

Tyr Leu Asp Ala Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys
20 25 30

Gly Arg Gly
35

<210> 34

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(12)

<223> X11 = R, G, S, A, K ó T

X12 = K, N, R, A, S, H ó Q

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(18)

<223> X16 = A, F, S, W, T, H, K, R, V, I, L, M, N, Q, G ó Y

X17 = R, A, L, M, V, Q, K, F, I, W, N, D, E, H, S, T, G ó Y

X18 = K, R, F, I, L, Y, V, M, A, G ó H

<400> 34

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Xaa Xaa Tyr Leu Asp Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo.

1. Un polipéptido seleccionado del grupo integrado por las SEC ID NOS:6 a 32, y sus fragmentos, derivados y variantes funcionalmente equivalentes.
2. Un polinucleótido que codifica una secuencia polipeptídica de la reivindicación 1, o una variante degenerada del mismo.
3. Un vector que comprende un polinucleótido de la reivindicación 2.
4. Una célula huésped que comprende un vector de la reivindicación 3.
5. Un método para la producción de un polipéptido, que comprende:
 - a) cultivar la célula huésped de la reivindicación 4 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido; y
 - b) recuperar el polipéptido del cultivo de la célula huésped.
6. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la reivindicación 1 en combinación con un vehículo aceptable para uso farmacéutico.
7. Una composición para terapia génica que comprende un polinucleótido de la reivindicación 2 en combinación con un vector para terapia génica terapéuticamente efectivo.
8. El polipéptido de la reivindicación 1, en el cual dicho polipéptido se representa mediante SEC ID NO:25.
9. El polipéptido de la reivindicación 1, en el cual dicho polipéptido se representa mediante SEC ID NO:26.
10. El polipéptido de la reivindicación 1, en el cual dicho polipéptido se representa mediante SEC ID NO:27.
11. Un anticuerpo purificado que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 1.

...entre aproximadamente 0,1 µg/kg y aproximadamente 1 mg/kg.

12. Uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido que sea agonista del receptor del GLP-1 y antagonista del glucagón para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno metabólico en un mamífero.
13. El uso de la reivindicación 12, en el cual el péptido se selecciona del grupo integrado por las SEC ID NOS:6 a 32, y sus fragmentos, derivados y variantes funcionalmente equivalentes.
14. El uso de la reivindicación 13, en el cual el péptido se selecciona del grupo integrado por la SEC ID NO:25, SEC ID NO:26 y SEC ID NO:27.
15. El uso de la reivindicación 12, en el cual dicho trastorno metabólico es la diabetes tipo 2.
16. El uso de la reivindicación 12, en el cual dicha cantidad terapéuticamente efectiva oscila entre aproximadamente 0,1 µg/kg y aproximadamente 1 mg/kg.
17. El uso de la reivindicación 12, en el cual dicho trastorno metabólico es el estado pre-diabético de intolerancia a la glucosa.

p.: BAYER CORPORATION

**PÉPTIDOS QUE ACTÚAN COMO AGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLP-1 Y
COMO ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLUCAGÓN Y SUS MÉTODOS
DE USO FARMACOLÓGICO**

RESUMEN

La invención provee polipéptidos que actúan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón. Dichos polipéptidos son útiles para el tratamiento de individuos con diabetes tipo 2 u otros trastornos metabólicos.

1-500-178-57171 0100

182
181

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacon : 04033093 00000000 Folios: 162
Fecha (RMB): 2004-04-07 16:44:28
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACT 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 23,930
FECHA : MARZO 23 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	20338566	23/03/2004	45,544,600.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUS	422,000.00
		TOTAL :	\$ 422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

USUARIO RADICADOR

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.
- Descripción de la invención.
- Dibujos de ser estos pertinentes.
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.

() ()

() ()

() ()

() ()

COMPLETA ()

INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.
- Comprobante de pago de las tasas establecidas

() ()

() ()

() ()

() ()

COMPLETA ()

INCOMPLETA ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.
- Representación gráfica del esquema de trazado
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.

() ()

() ()

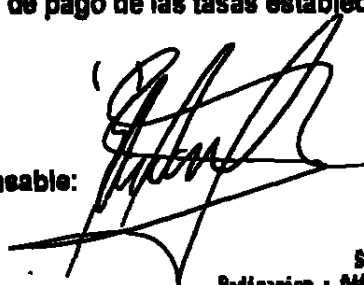
() ()

() ()

COMPLETA ()

INCOMPLETA ()

Firma Responsable:



Fecha:

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 9403093 0000000

Folios: 162

Fecha (HH): 2004-04-07 16:44:28

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC.

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
EMILIO FERRERO.
Apoderado(a)

Oficio N°
05539

ASUNTO:	Radicación N°	04-33093
	Solicitud internacional	PCT/US02/31693
	Fecha inicio fase nacional	05/05/2004
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La traducción de la solicitud internacional y de las reivindicaciones, tienen defectos de nitidez, se solicita presentar nueva copia totalmente legible, para su posterior estudio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 11 JUN. 2004
202051